

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude des sirtuines 1 et 3 dans des modèles in vivo et in vitro de néphrotoxicité aux acides aristolochiques

Mosseray, Pauline

Award date:
2018

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**ETUDE DES SIRTUINES 1 ET 3 DANS DES MODELES *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE
NEPHROTOXICITE AUX ACIDES ARISTOLOCHIQUES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Pauline MOSSERAY

Janvier 2018

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Étude des sirtuines 1 et 3 dans des modèles *in vivo* et *in vitro* de néphrotoxicité aux acides aristolochiques

MOSSERAY Pauline

Résumé

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) est une néphrite tubulointerstitielle progressive causée par l'ingestion d'acides aristolochiques (AA). Dans le but d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la NAA, notre laboratoire a précédemment validé un modèle *in vivo* d'intoxication aux AA chez des souris mâles C57Bl/6 (Declèves *et al.* 2016 ; Jadot *et al.* 2017). Au terme de l'intoxication, les souris présentent des caractéristiques similaires à celles reportées chez des patients souffrant de NAA.

Durant les dernières années, l'effet protecteur des sirtuines 1 et 3 (SIRT1/3) a été rapporté dans de nombreux modèles de néphropathies. Dans ce cadre, le but de cette étude est d'évaluer l'implication potentielle des SIRT1/3 durant la NAA. Pour ce faire, des souris mâles C57Bl/6 ont été intoxiquées avec une dose de 3,5 mg/kg d'AA par injection intrapéritonéale durant 4 jours. Les souris ont été sacrifiées après 12, 24, 48, 72 ou 96 heures et 10 jours d'intoxication. L'analyse des différents paramètres indique une altération rénale morphologique et fonctionnelle depuis 72 heures après le début de l'intoxication, jusqu'à la fin du protocole. L'analyse de l'expression des SIRT1/3 a suggère une oscillation de l'expression relative de l'ARNm de SIRT1 et une sous-expression de SIRT3, aussi bien protéique qu'en ARNm.

Dans un second temps, l'implication des SIRT1/3 a été évaluée dans un modèle *in vitro* d'intoxication aux AA de cellules épithéliales tubulaires proximales humaines (HK-2). Pour ce faire, les cellules ont été intoxiquées avec une concentration de 50 μ M d'AA durant 3, 6, 12 et 24 heures et une concentration de 10 μ M a ensuite été utilisée durant 24, 48, 72 et 96 heures. Les résultats désignent des altérations mitochondriales après 24 heures d'intoxication à une concentration de 50 μ M, ainsi qu'une surexpression protéique et en ARNm de SIRT1 pour les deux concentrations testées. Ces résultats indiquent qu'une surexpression de SIRT1/3 pourrait être étudiée dans les modèles d'intoxication *in vivo* et *in vitro* afin d'observer une éventuelle protection.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur: N. Caron **Co-promoteur:** T. Arnould

REMERCIEMENTS

Au terme de cette année de mémoire, je tiens à remercier chaleureusement Nathalie pour tous ses bons conseils, ses relectures, le merveilleux accueil qu'elle m'a réservé dans son laboratoire, ainsi que son petit côté « *maman poule* ». Je remercie également le Professeur Thierry Arnould de m'avoir offert la chance de pouvoir faire de la culture cellulaire, tout en m'apprenant la rigueur que cela exige.

Merci aux membres du jury pour leur participation à l'évaluation de ce mémoire, ainsi que pour le temps consacré.

Merci à Jean-François et Bélinda pour l'aide apportée dans mes manipulations. A toi, Jean-François, merci aussi pour les petites pauses-gâteaux !

Un tout grand merci à la « *Team Dyso* » pour les critiques constructives, malgré mon anglais désastreux. Un merci spécial à Patsy et Julie. La première pour m'avoir si bien conseillée et assistée quand j'étais en difficulté. La seconde pour son aide dans les manips, en particulier dans l'apprentissage de « *l'immunoprécipitation de mitochondries* ». Merci à Maud, Antoine, Noëlle et surtout Martine pour tous les apprentissages dispensés durant cette année.

Je tiens à remercier aussi les autres mémorants, avec lesquels j'ai passé de merveilleux moments... Plus particulièrement Pauline, Christophe et mon incroyable Jérémy, qui sont à mon écoute depuis plusieurs années et avec lesquels j'ai pu partager et rigoler sur de nombreux sujets ! Merci à vous d'avoir été là pour moi.

De la même manière, je remercie tous mes amis pour m'avoir supportée et soutenue durant ces années d'étude, qui n'ont pas toujours été réjouissantes. Merci à Marie-Catherine pour son oreille attentive, les Kinder après la piscine, son réconfort dans les moments de doutes et de larmes. Et tout simplement parce que tu es la meilleure ! Merci à toi et Rémi pour toutes les soirées jeux de société qui m'ont permis de décompresser, malgré l'esprit de compétition phénoménal de Rémi. Merci à Alexis, parce que quel que soit mon état de désespoir, il arrive toujours à me faire rire. Merci enfin à Amaury et Cédric, pour leur présence indéfectible à mes côtés depuis plus de 10 ans maintenant, malgré mon caractère de cochon, mon emploi du temps de ministre et mon esprit complètement cinglé !

Je remercie également ma famille, sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible. Merci à ma maman pour avoir toujours été si fière de moi, pour m'avoir soutenue et aimée, même lorsque je faisais fausse route, pour m'avoir légué ce brin de folie que je porte en moi et, surtout, pour m'avoir toujours laissé penser que quoi que j'entreprenne, je le réussirais. Merci à mon papa, pour tout l'amour qu'il me donne, même sans le dire, pour l'intérêt qu'il porte à tout ce que je fais, parce qu'il m'a transmis la passion que je mets dans tout ce que j'entreprends et parce qu'il a toujours été beaucoup plus fier de moi qu'il ne l'a jamais dit. Merci à mes frères, Martin et Alexandre, sans qui ma vie serait bien monotone, et ma sœur, Louise, mon grain de malice dans l'adversité.

Un immense merci à Sébastien pour m'avoir toujours soutenue, secouée quand je devais l'être, pour avoir tout entrepris avec moi, m'avoir épaulée, écoutée et encouragée tous les jours un peu plus. Merci pour toutes les petites attentions au jour le jour.

Et parce qu'on garde le meilleur pour la fin, merci à mes quatre bouboules d'amour ! Merci pour l'accueil débordant de gaieté que vous m'avez apporté. Merci pour tous ces moments de rires, de joie, de travail intense... et pour les donuts et autres prévenances quand les larmes débordaient. Merci d'avoir fait de chez vous, chez moi aussi.

Audrey, merci pour ta douce présence, tes plats végétariens qui nous font toujours beaucoup rire et ta personnalité surprenante.

Blanche, merci pour tous nos riches échanges, ton rire de cochon, tes lancés de tartines, ton intérêt à mon égard. Merci pour avoir toujours mis une touche de folie dans notre quotidien et pour la collection Dory.

Olivia, merci pour les thés/café autour d'un bout de chocolat, d'une mousse ou d'un biscuit, pour les discussions franches et honnêtes, pour tout ce que tu m'as appris et pour m'avoir remonté le moral parfois aussi...

Inès, merci d'avoir été la meilleure encadrante que j'aurais pu rêver avoir. Merci de m'avoir toujours soutenue et écoutée. Merci non seulement d'avoir cru en moi, mais aussi de m'avoir permis de croire en moi... Et puis, merci de m'avoir fait confiance durant toute cette aventure. Je suis probablement encore plus cinglée que toi, sans doute est-ce grâce à cela que nous nous comprenons ! Merci pour tout ce que tu as fait pour moi : les attentions, les mots réconfortants, ta gentillesse tout simplement... Merci d'être toi et d'avoir été là pour moi.

Merci à toutes les quatre de m'avoir donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de cette aventure, toujours avec une motivation débordante !

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Ampère
AA	Acide aristolochique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANOVA	Analyse de variance
AROS	Active regulator of SIRT1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Cell Collection
ATP	Adénosine triphosphate
Blc	Blanc
BSA	Albumine de sérum bovin
CETP	Cellules épithéliales des tubules proximaux
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
Cisplatine	Cis-platinum
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cre	Créatinine
CREB	C-AMP response element-binding protein
CTL	Contrôle
CYP1A1/2	Cytochrome P450 A1/2
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tétrachlorhydrate
DBC1	Deleted in breast cancer 1
DFG	Débit de filtration glomérulaire
°C	Degré Celsius
DFG	Débit de filtration glomérulaire
dl	Décilitre
DLA-mito	DLA pour mitochondries isolées
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTAB	Dodecyltriméthylammonium bromide
EB	Extrémités branchées
EDTA	Ethylène-diamine-tétraacétique acide édétique
EL	Extrémités libres
ERR α	Estrogen-related receptor- α
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2

FOXO1	Forkhead box protein O1
g	Grammes
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
H	Heure
HCl	Acide chlorydrique
HK-2	Human kidney (cellules de tubule proximal de rein humain)
HO-1	Hème oxygénase-1
HPV-16	Human Papillomavirus-16
HuR	Hu-antigen R
IL1 β /6	Interleukine 1 β /6
IM	Médullaire internet
INT	Iodotétrazolium chloride
ISOM	Inner stripe of the outer medulla
I.p.	Intrapéritonéale
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramme
KIM-1	Kidney injury molecule-1
K-SFM	Keratinocyte Serum-Free Medium
L	Largueur
l	Longueur
LDH	Lactate Déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharides
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDA	Malondialdehyde
μ g	Microgramme
μ l	Microlitre
μ M	Micromolaire
mg	Milligramme
min	Minutes
miR	Micro RNA
ml	Millilitre
mOsm	Milliosmole
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
Na ⁺	Ion sodium
NAA	Néphropathie aux acides aristolochiques
NaCl	Chlorure de sodium

NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF	Fluore de sodium
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NEB	Néphropathie endémique des Balkans
NEP	Neutral endopeptidase
NES	Séquence d'export nucléaire
NF-κB	Nuclear factor kappa enhancer binding protein
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NRF2	Nuclear receptor factor 2
O ₂ ⁽⁻⁾	Radical anionique superoxyde
O-AADPr	O-acétyl-ADP ribose
OAT	Transporteurs d'anions organiques
OM	Médullaire externe
O-N	Over-night, toute la nuit
OSOM	Outer stripe of the medulla
PAS	Periodic Acid Shiff
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
P _{Cre}	Créatinine plasmatique
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α
pH	Potentiel hydrogène
PIB	Inhibiteur de phosphatase
PIC	Protease inhibitor cocktail
PKC	Protein kinase C
PNPP	Para-nitrophénylphosphate
PPARα/β	Peroxisome proliferator-activated receptor-α/β
PVDF	PolyVinylidène Fluoride
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPM	Rotation par minute
RTq-PCR	PCR quantitative en temps réel
SDS	Dodécylsulfate de sodium
S.E.M.	Erreur standard de la moyenne
SENP	Sentrin-specific protease
SIR2	Silencing information regulator 2
SIRT1/3	Sirtuines 1 et 3
Sur.	Surnageant
SOD1/2	Superoxyde dismutase 1/2
T25	Boîte de culture de 25 cm ²

T75	Boîte de culture de 75 cm ²
TA	Température ambiante
TGF β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TP	Tubules proximaux
Tris Base	Trishydroxyméthylaminométhane
U _{Cre}	Créatinine urinaire
UTR	Région de l'ARNm non-traduite
V	Volt
WT	Wild type

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

I. Le rein	1
II. La néphropathie aux acides aristolochiques.....	4
II.1. Historique.....	4
II.2. Caractérisation et activation des acides aristolochiques	5
II.3. Physiopathologie	7
II.4. Modèles expérimentaux	9
III. Les sirtuines.....	10
III.1. Généralités	10
III.2. Régulation des sirtuines 1 et 3	13
III.3. Les fonctions des sirtuines	15
III.4. Modèles expérimentaux	18
IV. Objectifs de ce mémoire.....	18

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Expérimentations <i>in vivo</i>	20
I.1. Animaux.....	20
I.2. Traitement	20
I.3. Récolte des échantillons.....	20
II. Analyses sur les échantillons récoltés lors du protocole <i>in vivo</i>	22
II.1. Immunoprécipitation de mitochondries	22
II.2. Histologie et immunohistochimie	22
II.3. Dosages plasmatiques	24
II.4. Dosages urinaires	25
II.5. Analyses sur les tissus rénaux.....	25
II.6. Analyses statistiques	29
III. Expérimentations <i>in vitro</i>	29
III.1. Cellules	29
III.2. Traitement	30
IV. Analyses sur les échantillons récoltés lors du protocole <i>in vitro</i>	30
IV.1. Tests de viabilité cellulaire	30
IV.2. PCR quantitative en temps réel.....	32

IV.3. Western blot	33
IV.4. Microscopie confocale	34
IV.5. Analyses statistiques	35

RÉSULTATS

I. Expérimentation <i>in vivo</i>	36
I.1. Données métaboliques	36
I.2. Évaluation de la fonction rénale.....	36
I.3. Caractérisation de la structure rénale et de la prolifération cellulaire.....	39
I.4. Évaluation de l'inflammation	47
I.5. Évaluation de la réponse anti-oxydante	47
I.6. Évaluation de l'expression des sirtuines	49
II. Expérimentation <i>in vitro</i>	50
II.1. Effets des AA sur la viabilité cellulaire	50
II.2. Protocole 1	51
II.3. Protocole 2	59

DISCUSSION

I. Expérimentation <i>in vivo</i>	61
II. Expérimentation <i>in vitro</i>	65
II.1. Protocole 1	66
II.2. Protocole 2	69
II.3. Conclusion de l'expérimentation <i>in vitro</i>	69
III. Conclusion et perspectives	69

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Introduction

I. Le rein

L'appareil urinaire est composé des reins, des uretères, de la vessie et de l'urètre. D'un point de vue anatomique, les reins sont situés dans le dos, de part et d'autre de la colonne vertébrale, entre le feuillet pariétal du péritoine et les muscles dorsaux (Silverthorn, 2007). Chaque rein est composé d'une capsule fibreuse lisse et d'un parenchyme rénal, lequel se subdivise en deux parties : le cortex et la médulla. La partie corticale se situe sous la capsule, autour de la médulla, où elle forme les colonnes de Bertin (Figure 1) (Lacour, 2013). La partie médullaire est composée des pyramides de Malpighi et est subdivisée en deux parties : la partie externe (OM, « *outer medulla* ») et interne (IN, « *inner medulla* »). L'OM se situe à la base des pyramides, directement en contact avec le cortex, et l'IM se situe à la pointe des pyramides, au niveau du bassinnet. L'OM est elle-même subdivisée en deux zones : l'OSOM (« *outer stripe of the outer medulla* »), située en contact avec le cortex, et l'ISOM (« *inner stripe of the outer medulla* »), située en contact avec l'IM (Figure 2). Finalement, l'IM se termine par des papilles rénales, qui sont au nombre de 15 à 20 par pyramide de Malpighi, et qui constituent le point de sortie de l'urine finale (Kriz & Bankir, 1988 ; Lacour, 2013). Le cortex et la médulla sont composés de néphrons et de vaisseaux sanguins. Chaque rein comprend un total d'environ 1 million de néphrons, lesquels constituent la plus petite unité fonctionnelle du rein, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'assurer toutes les fonctions rénales (Silverthorn, 2007). Les néphrons sont composés d'une première partie appelée le corpuscule de Malpighi et d'une seconde partie appelée le tubule urinaire, lesquelles vont assurer la formation de l'urine définitive par des mécanismes de filtration, de réabsorption et de sécrétion (Lacour, 2013 ; Silverthorn, 2007).

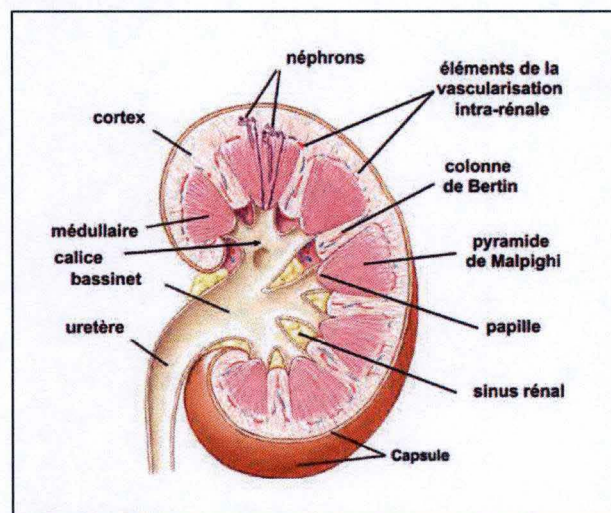


Figure 1. Structure générale d'un rein en coupe transversale (Silverthorn, 2007).

La principale fonction des reins est d'assurer le maintien de l'homéostasie hydro-électrolytique. En effet, le rein possède la capacité de maintenir l'équilibre ionique et hydrique ou encore de réguler l'équilibre acido-basique. Le rein présente également la propriété d'éliminer de nombreux déchets toxiques de l'organisme, tels que les produits du métabolisme. Ceux-ci comptent par exemple l'urée, qui permet l'excrétion de l'azote, et la créatinine, un produit du métabolisme musculaire. Les reins peuvent également éliminer du corps d'autres

composés endogènes tels que les hormones, ou encore certains métabolites de l'hémoglobine, ainsi que des déchets produits par des substances étrangères, telles que des toxines ou les médicaments (Silverthorn, 2007 ; Wheeler *et al.*, 2001). Finalement, le rein présente des fonctions endocrines : il permet par exemple la sécrétion d'érythropoïétine, laquelle permet de stimuler la production de globules rouges, ou encore la sécrétion de rénine. Celle-ci est notamment impliquée dans la régulation de l'homéostasie sodique et dans le contrôle de la pression artérielle *via* l'axe rénine-angiotensine-aldostérone (Lacour, 2013 ; Silverthorn, 2007). Le rein possède également un rôle dans l'homéostasie calcique, avec la conversion de la vitamine D3 en sa forme active (Wheeler *et al.*, 2001).

En ce qui concerne la perfusion rénale, le sang arrive aux reins par l'artère rénale, laquelle se ramifie en artères possédant un diamètre plus faible. Ces artères se ramifient elles-mêmes en conduits plus petits appelés artéριοles puis finalement en fin capillaires. Le sang s'écoule dans ces artéριοles afférentes jusqu'à atteindre un réseau spécifique de capillaires appelé glomérule. Celui-ci est composé d'approximativement 4 à 6 capillaires et est entouré de la partie initiale du néphron appelée capsule de Bowman. Le glomérule et la capsule de Bowman forment ensemble une unité appelée « corpuscule de Malpighi », qui constitue le lieu principal de filtration du sang (Lacour, 2013 ; Silverthorn, 2007). La capsule de Bowman se prolonge ensuite en différents segments tubulaires urinaires successifs : (1) le tubule proximal, segment auquel une attention particulière sera apportée au cours de ce mémoire, (2) la anse de Henlé, (3) le tubule distal et (4) le tube collecteur de Bellini (Figure 2). De plus, bien que 20 à 25% du débit cardiaque parcourt les reins à chaque instant, seulement un cinquième du volume sanguin rénal sera filtré. La fraction restante continuera de s'écouler *via* les artéριοles efférentes jusqu'à atteindre les capillaires péri-tubulaires. Il sera ensuite dirigé dans des veinules, jusqu'à atteindre la veine rénale qui conduira alors le sang hors du rein (Silverthorn, 2007).

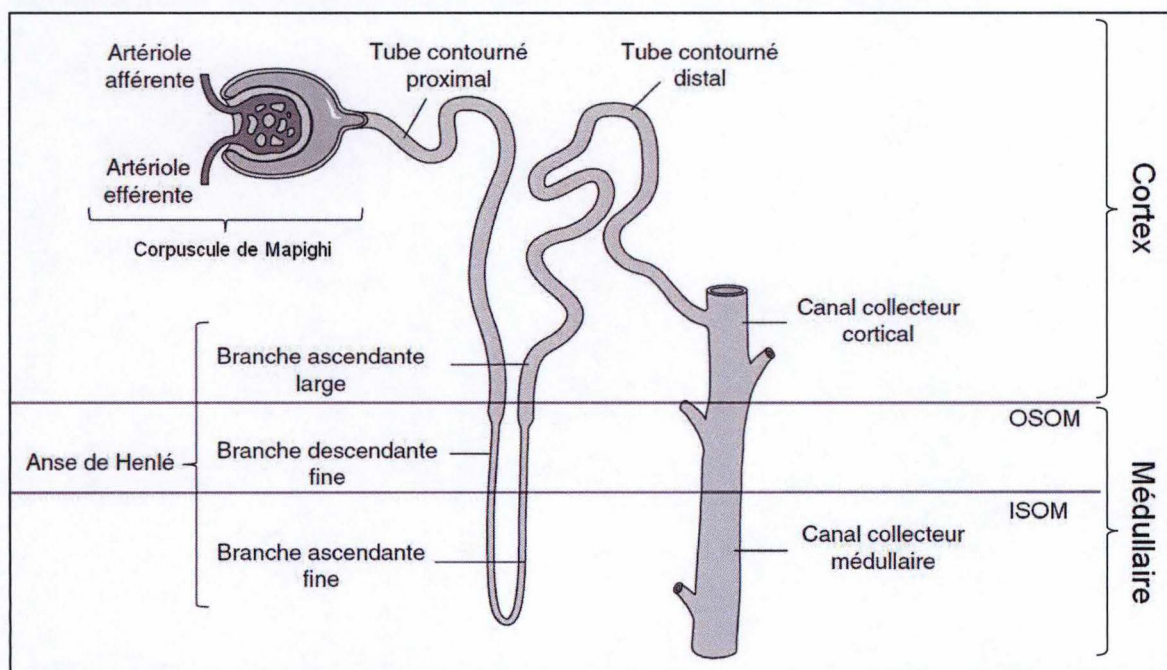


Figure 2. Structure rénale et schématisation des différents segments du néphron. Schéma modifié depuis la publication de Gueutin *et al.* (2011).

Les cellules épithéliales du tubule proximal (CETP) se distinguent par une morphologie haute et cubique, ainsi que par une bordure en brosse importante. Celle-ci est constituée de nombreuses microvillosités au pôle apical de la cellule, lesquelles contiennent un nombre élevé

de mitochondries. Cette bordure en brosse permet d'augmenter la surface de contact cellulaire avec l'ultrafiltrat contenu dans la lumière du tubule proximal, favorisant ainsi les échanges. De ce fait, les tubules contournés proximaux sont responsables de 65% de la réabsorption des solutés et de l'eau. Ils sont également responsables de la sécrétion des ions H^+ et de l'ammoniac (Lacour, 2013 ; Wheater *et al.*, 2001). Les tubules proximaux (TP) possèdent une conformation enroulée, appelée « *pars convoluta* », après quoi ils adoptent une conformation droite, appelée « *pars recta* ». Ils sont composés de trois segments successifs, les segments S1, S2 et S3. Le segment S1 comprend la portion du TP allant de la sortie du corpuscule de Malpighi aux deux tiers de la « *pars convoluta* ». Il est composé d'une bordure en brosse très développée, avec beaucoup de microvillosités et une capacité élevée d'endocytose. De ce fait, il s'agit du segment possédant le plus grand nombre de mitochondries, ainsi que la plus grande capacité de réabsorption. Le segment S2 comprend la fin de la « *pars convoluta* » et le début de la « *pars recta* », tandis que le segment S3 est constitué de la fin de la « *pars recta* ». Les segments S2 et S3 possèdent une capacité de réabsorption et d'endocytose limitée en comparaison au segment S1 (Kriz & Bankir, 1988 ; Zhuo & Li, 2013).

La réabsorption assurée par les TP peut être soit passive, soit médiée par un transport actif. Par exemple, le passage du sodium depuis la lumière tubulaire jusqu'au cytosol des CETP se fait par voie passive. En effet, la composition de l'ultrafiltrat étant similaire à la composition plasmatique, la concentration en Na^+ dans la lumière des TP est supérieure à la concentration intracellulaire. Le Na^+ entre donc passivement dans les cellules en suivant son gradient électrochimique. Par ailleurs, la pompe Na^+/K^+-ATP^{ase} membranaire située au pôle basal permet l'entrée de deux ions potassium en échange de trois ions sodium, grâce à l'utilisation d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP). De plus, l'entrée du sodium dans la cellule depuis la lumière des TP permet également l'entrée de glucose par transport actif secondaire (Silverthorn, 2007).

Cependant, le sodium n'est pas le seul acteur ayant la capacité d'entrer dans les CETP par diffusion passive. En effet, c'est également le cas de l'urée. Ce produit issu du catabolisme de l'azote ne possède pas de transporteur à la surface des CETP. L'urée met donc à profit le gradient osmotique de l'eau. En effet, à la suite de la réabsorption du sodium, l'eau est attirée à l'intérieur des CETP, induisant une diminution de la quantité d'eau présente dans la lumière des TP. De ce fait, la concentration en urée augmente dans la lumière des TP, permettant donc une diffusion passive de l'urée vers le cytoplasme des CETP. Finalement, les CETP ont également la capacité de réabsorber les protéines de faible poids moléculaire par endocytose. Une fois internalisées, ces protéines sont soit dégradées en acides aminés, soit transférées dans le liquide extracellulaire par transcytose (Silverthorn, 2007).

Enfin, les CETP possèdent également des transporteurs d'anions organiques (OAT, « *organic anion transporter* »), lesquels permettent l'excrétion de xénobiotiques et de sous-produits du métabolisme depuis le flux sanguin vers la lumière des TP. Trois de ces transporteurs sont fortement exprimés dans les reins : les OAT1/3/4. Les OAT1/3 sont situés au pôle basal de la cellule tandis que les OAT4 sont localisés au pôle apical. Ces transporteurs permettent l'excrétion de protéines ayant un poids moléculaire inférieur à 400-500 kDa, ainsi que l'excrétion des anions organiques hydrophiles. Ils permettent notamment l'excrétion de l'urate et de la créatinine, ainsi que des antibiotiques et antiviraux. (Nigam *et al.*, 2015 ; Sekine *et al.*, 2006). Par ailleurs, comme ce sera explicité plus tard dans ce mémoire, ces OAT ont également été reportés comme ayant un rôle majeur dans l'intoxication des CETP par les AA (Dickman *et al.*, 2011).

II. La néphropathie aux acides aristolochiques

Au cours des dernières années, l'utilisation d'herbes provenant de la médecine traditionnelle chinoise est devenue de plus en plus courante dans la médecine occidentale. Par exemple, l'utilisation de plantes chinoises telles que le *Ginkgo biloba* ou le *Panax ginseng* a été reportée comme permettant de lutter contre la maladie d'Alzheimer (Fu & Li, 2009). De même, certaines substances contenues dans des plantes chinoises ont été reconnues comme ayant des effets antidépresseurs (Perviz *et al.*, 2016), cardio-protecteurs lors des dommages rénaux induits par l'ischémie-reperfusion (Chang *et al.*, 2016) ou encore curatifs dans plusieurs types de chimiothérapies (Liu *et al.*, 2016). De ce fait, il est actuellement primordial de soumettre ces « médecines naturelles » à des contrôles d'efficacité, de toxicité et de conformité au même titre que les médicaments mis au point par l'industrie pharmaceutique. En effet, tout comme les médicaments, les herbes utilisées en médecine traditionnelle chinoise peuvent engendrer des effets secondaires, notamment au niveau du rein et du foie, organes clés dans le processus de détoxification de l'organisme. Ces effets secondaires peuvent être classés en 4 catégories : (1) la toxicité intrinsèque des plantes, (2) la toxicité induite par des métaux lourds ou des médicaments pouvant contaminer les plantes, (3) l'utilisation de plantes dont l'identification est erronée et (4) les interactions indésirables entre certains composés présents dans les plantes et certains médicaments (Isnard Bagnis *et al.*, 2004). Dans ce contexte, la néphropathie aux herbes chinoises a été caractérisée et a reçu, dans un premier temps, l'appellation clinique de « *Chinese herb nephropathy* », laquelle est caractérisée par une fibrose interstitielle, une atrophie des tubules proximaux et par des cancers urothéliaux (Vanherweghem *et al.*, 1993). Suite à l'identification de l'agent néphrotoxique, cette pathologie a ensuite été progressivement rebaptisée « néphropathie aux acides aristolochiques » (Debelle *et al.*, 2008).

II.1. Historique

La néphropathie aux acides aristolochiques a été décrite pour la première fois en 1992 lorsque deux patientes se présentèrent dans un hôpital belge avec une insuffisance rénale d'origine inconnue. La dégradation de leur état de santé a rapidement nécessité un traitement par dialyse, suivi à terme d'une transplantation rénale (Vanherweghem *et al.*, 1993). Curieusement, ces deux patientes ne présentaient aucuns antécédents de problèmes rénaux, ne permettant donc pas d'expliquer leur atteinte rénale en phase terminale. Après anamnèse, il est apparu que leur point commun était la prise d'un régime amincissant proposé par une clinique bruxelloise au cours de l'année précédente (Nortier *et al.*, 2015). La composition chimique des pilules amaigrissantes (Figure 3A) à la base de ce régime avait été modifiée en 1990 par l'introduction de la plante *Stephania tetrandra*. Après analyse phytochimique des gélules, il est rapidement apparu que celles-ci n'étaient pas composées de tétrandrine mais d'acide aristolochique ($0,65 \pm 0,56$ mg/g de poudre). L'hypothèse pouvant expliquer cette découverte était une substitution de la plante *Stephania tetrandra* (nom Pin Yin : *Han Fang Ji*) par la plante *Aristolochia fangchi* (nom Pin Yin : *Guang Fang Ji*). En effet, la confusion entre ces deux plantes est fréquente dû à leur appartenance à la même famille thérapeutique « Fang Ji » dans la médecine chinoise (Debelle *et al.*, 2008 ; Nortier *et al.*, 2015).

Par la suite, des adduits d'ADN spécifiques aux acides aristolochiques (AA) ont été détectés dans les reins et le foie provenant des patients intoxiqués aux herbes chinoises. L'acide aristolochique a alors été identifié comme étant l'agent toxique à l'origine de la néphropathie aux herbes chinoises, menant à une nouvelle appellation de la maladie : « *Aristolochic acid nephropathy* » ou néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) (Debelle *et al.*, 2008). Depuis lors, l'hypothèse du rôle prépondérant des AA dans la néphropathie a été corroborée par le

développement de plusieurs modèles expérimentaux, notamment chez des lapins blancs New Zealand femelles (Cosyns *et al.*, 2001) ou encore chez des rats Wistar mâles (Debelle *et al.*, 2002).

D'autre part, depuis la fin des années 1950, une autre néphropathie appelée la « Néphropathie endémique des Balkans » (NEB) a été observée en Bosnie, Bulgarie, Croatie, Roumanie et Serbie, principalement dans des villages agricoles situés aux abords du Danube. Depuis la première description de la NEB, de nombreuses études ont été menées afin d'identifier la cause de cette maladie. De nombreuses hypothèses ont été proposées telles que la possible implication des métaux lourds, de virus, ou encore de toxines, mais aucune de ces hypothèses ne permettait d'expliquer la physiopathologie particulière de la NEB (Grollman *et al.*, 2007). Lorsque la NAA a été décrite, un lien a été établi entre ces deux entités cliniques, sur base de la similitude du contexte physiopathologique. L'hypothèse de l'implication des AA dans la NEB a ensuite été renforcée grâce à la détection d'adduits d'ADN spécifiques aux AA dans les reins des patients atteints de NEB. Par la suite, plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication d'*Aristolochia clematitis* (Figure 3B), appartenant à la même famille qu'*Aristolochia fangchi*, dans la NEB. En effet, cette plante est connue comme étant une mauvaise herbe habituellement rencontrée parmi les cultures de blé dans les régions situées aux abords du Danube (Mantle *et al.*, 2016).

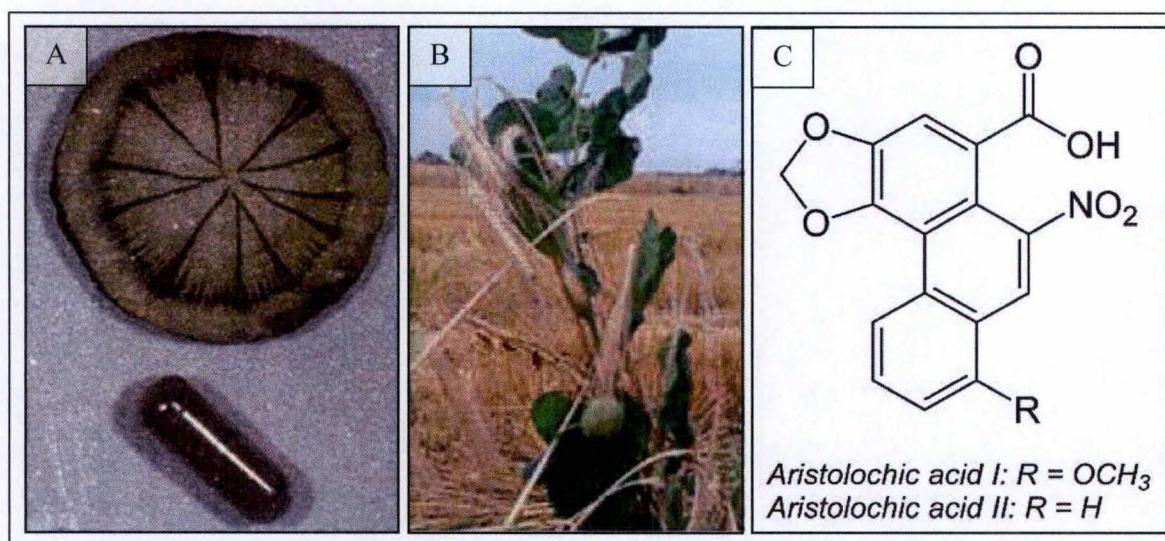


Figure 3. Acides aristolochiques. (A) Coupe transversale d'une racine d'*Aristolochie* et gélule amaigrissante composée d'AA, (B) plant *Aristolochia clematitis* poussant dans une culture aux alentours des rives du Danube et (C) structure chimique des AA-I/II (Debelle *et al.*, 2008).

Pour conclure, depuis sa découverte en 1992, de nombreux cas de patients atteints de NAA sont recensés chaque année. Les principaux facteurs expliquant ce recensement sont l'augmentation du recours à la médecine chinoise en Occident, ainsi que l'utilisation quasiment exclusive de la médecine traditionnelle dans la majeure partie des pays asiatiques. De plus, l'utilisation d'Internet est également en cause, avec la vente de produits contenant des AA en libre-service. De ce fait, étant donné le caractère particulièrement toxique des AA, la NAA et la NEB sont devenus un problème de santé mondiale (Gökmen *et al.*, 2013 ; Jadot *et al.*, 2017).

II.2. Caractérisation et activation des acides aristolochiques

Les AA sont des acides carboxyliques nitrophenanthrènes appartenant au groupe des hydrocarbures polycycliques. Il existe deux types principaux d'AA (Figure 3C) : les AA-I

(acide 8-méthoxy-6-nitro-phénanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylique) et les AA-II (acide 6-nitro-phénanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylique). Les AA sont principalement transportés dans les tissus par les « *Organic Anion Transporter* » (OAT), lesquels sont exprimés dans divers organes tels que les reins ou le foie. Au niveau du rein, ce sont principalement les cellules épithéliales tubulaires proximales qui expriment ces OAT, expliquant de ce fait la toxicité importante des AA au niveau des tubules proximaux (Dickman *et al.*, 2011 ; Nigam *et al.*, 2015).

Une fois transportés dans le tissu *via* la circulation sanguine, les AA sont ensuite métabolisés dans la cellule par une réaction de nitroréduction. Cette métabolisation peut être réalisée par plusieurs enzymes au niveau hépatique et rénal. Dans le foie, l'enzyme majeure permettant la métabolisation des AA est le cytochrome P450 (CYP) 1A2, qui se situe dans les microsomes hépatiques. Le CYP1A1 permet également la métabolisation des AA, mais dans une moindre mesure (Stiborová *et al.*, 2008). Dans les microsomes rénaux, c'est la NADPH/CYP réductase qui est la principale responsable de l'activation des AA (Debelle *et al.*, 2008). Enfin, dans le cytosol des hépatocytes et des cellules rénales tubulaires proximales, la NAD(P)H:quinone oxydoréductase et la xanthine oxydase participent également à l'activation des AA, mais en plus faible proportion que les enzymes citées ci-dessus (Shibutani *et al.*, 2007; Stiborová *et al.*, 2008).

Au cours de leur métabolisation, les AA transitent par un état ionique avant de former le métabolite final appelé aristolactame. C'est lorsque les AA sont dans leur conformation ionique qu'ils induisent la plus grande toxicité. En effet, les ions *N*-acylnitrénium cycliques possèdent une charge positive délocalisée qui est capable de lier de façon covalente les groupes aminés exocycliques des bases puriques, menant à la production d'adduits d'ADN (Figure 4). Ces adduits bloquent la transcription et la réplication de l'ADN, provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et déclenchant l'apoptose (Debelle *et al.*, 2008 ; Shibutani *et al.*, 2007). L'adduit d'ADN le plus souvent recensé *in vivo* est le 7-(déoxyadénosine-N6-yl) aristolactame I (dA-AL-I), lequel induit principalement des transversions AT→TA. Cette mutation spécifique a été souvent reportée dans le codon 61 du proto-oncogène *H-ras* dans des tumeurs prélevées au niveau du pré-estomac et des poumons chez des rongeurs intoxiqués aux AA-I. De même, une surexpression de la protéine *p53* a été observée chez des patients souffrant de NAA (Arlt *et al.*, 2002 ; Nortier *et al.*, 2000). Finalement, ces adduits d'ADN induisent également des tumeurs urothéliales malignes, ainsi que des carcinomes et des cancers des voies urinaires. De ce fait, les AA ont été classifiés en 2002 comme des carcinogènes humains de type I par l'organisation internationale pour la recherche contre le cancer (Debelle *et al.*, 2009).

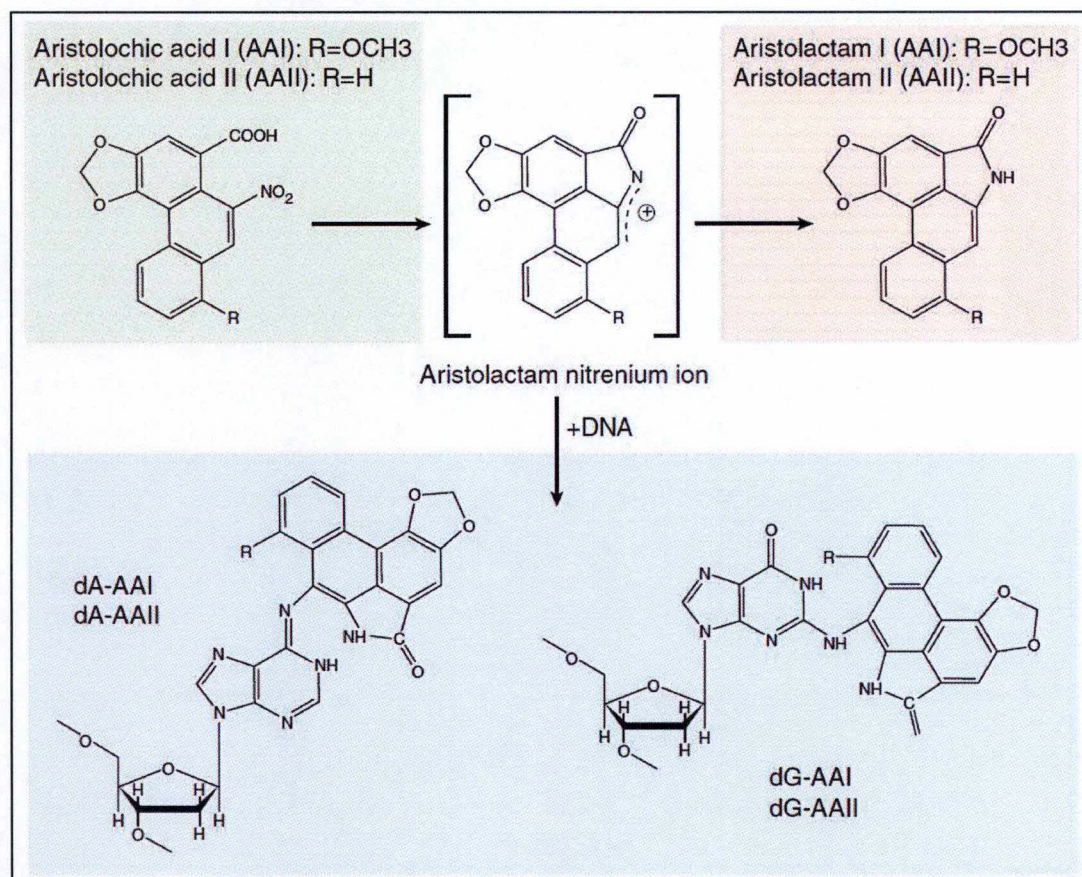


Figure 4. Métabolisation des acides aristolochiques et formation d'adduits d'ADN (Debelle *et al.*, 2008).

Une différence de pathogénicité a été mise en évidence entre les deux types d'AA. En effet, les AA de types I et II ont tous deux été identifiés comme étant carcinogènes, alors que seul le type I a été caractérisé comme étant néphrotoxique. Cette néphrotoxicité se traduit par l'induction d'une fibrose rénale tubulointerstitielle importante ainsi que par le développement de dommages tubulaires irréversibles (Huang *et al.*, 2013 ; Shibutani *et al.*, 2007). En outre, certains facteurs environnementaux et géniques pourraient influencer la toxicité des AA. En effet, le tabagisme, les composés toxiques environnementaux et l'administration concomitante de médicaments pourraient influencer la toxicité des AA (Nortier *et al.*, 2015). De même, les gènes codant pour les enzymes permettant l'activation des AA présentent des polymorphismes, ce qui induit une variabilité au niveau de chaque individu. Tous ces paramètres considérés dans leur ensemble permettraient donc d'émettre une hypothèse sur la variabilité observée chez les patients, et notamment sur l'atteinte rénale qui n'est observée que chez 5% des patients ayant suivi le régime amincissant (Stiborová *et al.*, 2003).

II.3. Physiopathologie

La NAA est le plus souvent détectée chez des patients *via* des examens de routine tels qu'une prise de sang. Bien que la pression sanguine soit normale chez la moitié des patients, une anémie est souvent diagnostiquée ainsi qu'une augmentation de la créatinine plasmatique (Vanherweghem *et al.*, 2003). Du point de vue urinaire, l'excrétion de 5 protéines de faible poids moléculaire (les microglobulines β_2 et α_1 , la cystatine C, la protéine des cellules de Clara, et la « retinol binding protein ») est une constante chez les patients atteints de NAA. De même,

le ratio entre l'excrétion de ces protéines de faible poids moléculaire et celle de l'albumine est élevé, suggérant une atteinte des tubules proximaux (Nortier *et al.*, 2015). L'atteinte précoce de ces tubules est également corroborée par la diminution des taux urinaires de la « *neutral endopeptidase* » (NEP), une ectoenzyme de la bordure en brosse des tubules proximaux. De plus, chez des patients atteints d'insuffisance rénale au stade terminal, cette protéine n'apparaît plus dans les urines (Debelle *et al.*, 2008 ; Nortier *et al.*, 1997).

Du point de vue macroscopique, les reins d'un patient atteint de NAA sont asymétriques et présentent une taille réduite ainsi qu'un amincissement du cortex (Debelle *et al.*, 2008). En ce qui concerne l'évolution de la pathologie, deux phases de la NAA ont été décrites, une première phase d'insuffisance rénale dite aiguë (IRA) qui apparaît dans les 5 jours suivant l'exposition aux AA, et une seconde phase dite chronique (IRC), se développant dans un délai moyen de 7 jours après le début de l'intoxication (Lebeau *et al.*, 2005).

Au cours de l'IRA, les cellules tubulaires proximales perdent rapidement l'intégrité de leur cytosquelette, ainsi que leur polarité. Une localisation ectopique des protéines d'adhésion a également été décrite, laquelle mène à une augmentation de l'apoptose et de la nécrose cellulaires (Vaidya *et al.*, 2008). Ces deux phénomènes de mort cellulaire se traduisent par la desquamation des cellules épithéliales des tubules proximaux, laquelle se reflète sur le plan histologique par des tubules proximaux nécrotiques (Figure 5A) (Nortier *et al.*, 2015). De plus, l'apoptose et la nécrose induisent également un phénomène inflammatoire. En effet, des changements vasculaires s'opèrent afin de permettre l'extravasation de cellules immunitaires tels que les neutrophiles, les macrophages, ou encore les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Kinsey *et al.*, 2008). Cette infiltration de cellules immunitaires a notamment été reportée chez des patients atteints de NAA (Pozdzik *et al.*, 2010), et confirmée dans des modèles expérimentaux (Pozdzik *et al.*, 2008). Finalement, durant cette phase, les enzymes anti-oxydantes ont été reportées comme possédant une activité diminuée (Pozdzik *et al.*, 2008).

L'apoptose et la nécrose apparaissant lors de l'IRA s'accroissent au cours de l'IRC, menant peu à peu à une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales des tubules proximaux, notamment observée dans un modèle expérimental chez le rat (Pozdzik *et al.*, 2008 ; Pozdzik *et al.*, 2010). Les cellules mésenchymateuses vont alors sécréter du collagène de type IV. Conjointement, l'inflammation présente depuis la phase aiguë va s'intensifier, avec une augmentation de l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu. Cette inflammation va progressivement induire l'activation des fibroblastes résidents, lesquels vont sécréter du collagène de type I et III. L'augmentation des dépôts de collagène va alors conduire à une fibrose interstitielle (Figure 5C), caractéristique majeure de la phase chronique de la NAA (Pozdzik *et al.*, 2010).

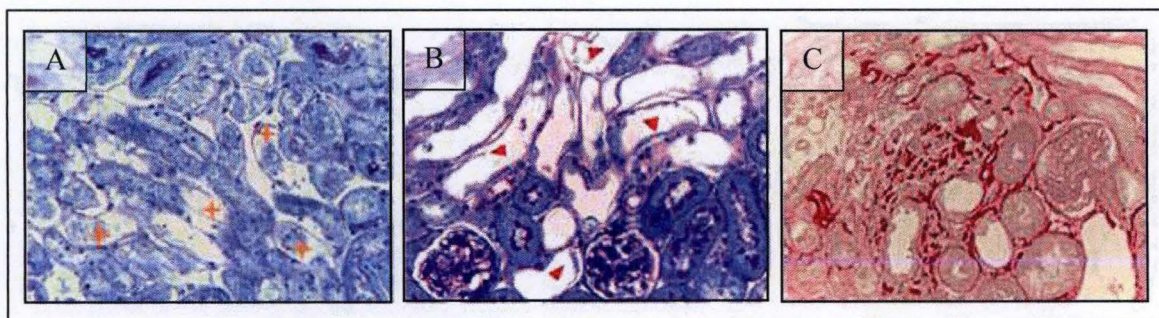


Figure 5. Coupes histologiques des différentes altérations observables durant l'IRA et l'IRC dans un modèle murin intoxiqué aux AA. (A) Tubules nécrotiques (croix oranges), (B), tubules atrophiques (triangles rouges) et (C) dépôts de collagènes visualisés en rouge (Jadot *et al.*, 2017).

L'IRC induite par la NAA se caractérise également par des tubules proximaux atrophiques (Figure 5B), suite à la desquamation totale des cellules épithéliales des tubules proximaux (Pozdzik *et al.*, 2008). Une autre caractéristique de l'IRC concerne les dommages mitochondriaux, qui se caractérisent généralement par une fission du réseau mitochondrial, une perte de la biogenèse mitochondriale, une diminution de la production d'ATP et une augmentation du stress oxydatif (Galvan *et al.*, 2017). Pozdzik *et al.* (2008) ont confirmé ces dommages dans un modèle expérimental chez le rat, ainsi que la diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes au cours de l'IRC.

Finalement, bien que ces deux phases soient distinctes d'un point de vue pathologique, il est important de souligner qu'elles sont cependant interconnectées. En effet, de nombreuses études investiguent couramment la transition entre l'IRA et l'IRC dans différents modèles expérimentaux (Venkatachalam *et al.*, 2015 ; Ferenbach & Bonventre, 2016). Dans ces études, il a par exemple été mis en évidence que les patients ayant souffert d'un épisode d'IRA présente une plus grande probabilité de développer une IRC en comparaison avec des patients n'ayant jamais souffert d'IRA (Coca *et al.*, 2012). A cet égard, il semblerait que cette connexion entre l'IRA et l'IRC soit due à de nombreux facteurs tels que l'inflammation, la fibrose interstitielles, l'ischémie, les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydatif (Chawla & Kimmel, 2012 ; Venkatachalam *et al.*, 2015).

II.4. Modèles expérimentaux

Depuis de nombreuses années, des traitements à base d'AA sont étudiés chez l'être humain dans le cadre de plusieurs maladies, telles que le cancer par exemple (Kupchan & Doskotch, 1962). Malgré cela, les premières études *in vivo* réalisées dans le but d'évaluer la toxicité des AA n'ont débuté qu'en 1982. À cette époque, Mengs *et al.* (1982) avaient administré par gavage un mix d'AA-I/AA-II (78/22) à des rats Wistar mâles et femelles durant 3, 6 ou 12 mois. À la fin du protocole, les rats présentaient des tumeurs métastasées et plusieurs individus étaient morts avant la fin de l'étude (Mengs *et al.*, 1982). Au vu de la toxicité décrite dans cette étude, de nombreuses études *in vivo* ont été initiées au cours des années qui ont suivi, qui avaient notamment pour but d'investiguer plus en profondeur les mécanismes de la NAA, le plus souvent chez des rats (Debelle *et al.*, 2002 ; Pozdzik *et al.*, 2008) ou des souris (Huang *et al.*, 2013 ; Shibutani *et al.*, 2007).

Les caractéristiques physiopathologiques observées dans ces divers modèles de NAA sont récurrentes avec, d'un point de vue fonctionnel, une augmentation de la créatinine et de l'urée plasmatiques, ainsi que de la protéinurie, durant les deux phases de la NAA (Lebeau *et al.*, 2005 ; Shibutani *et al.*, 2007). D'un point de vue structurel, une nécrose des tubules proximaux est observée durant la phase aiguë. Celle-ci est suivie d'une atrophie tubulaire et d'une fibrose interstitielle durant la phase chronique. Une infiltration de cellules immunitaires, ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, ont également été observées. De plus, tout au long de l'intoxication aux AA, une augmentation de la prolifération cellulaire a été observée (Pozdzik *et al.*, 2008). Finalement, des adduits d'ADN ont été identifiés dans plusieurs organes tels que les reins, le foie, la vessie, l'estomac, ou encore les poumons (Shibutani *et al.*, 2007).

Dans le cadre de ce mémoire, un modèle expérimental de NAA induite chez des souris C57Bl/6 mâles a été développé et validé précédemment dans notre laboratoire (Declèves *et al.*, 2016 ; Jadot *et al.*, 2017). La souche utilisée avait été précédemment utilisée dans plusieurs études (Huang *et al.*, 2013) et permet, en outre, l'utilisation de souris transgéniques dans des expérimentations futures. De plus, l'utilisation de souris mâles permet de diminuer la variabilité induite par les hormones chez des souris femelles.

III. Les sirtuines

III.1. Généralités

a) Historique

Les sirtuines ont été historiquement décrites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et identifiées sous le nom du gène SIR2 (« *Silencing information regulator 2* »). Il a été observé que les sirtuines sont fortement conservées durant l'évolution, en raison des nombreux avantages qu'elles confèrent (Michan & Sinclair, 2007; Nogueiras *et al.*, 2012). À l'origine, le gène *SIR2* a été décrit comme étant un facteur d'extinction de l'expression génique qui, une fois muté, ne permettait plus d'inhiber la transcription des loci *HMR* et *HML* chez les levures, les rendant ainsi stériles (Michan & Sinclair, 2007; Sebastián *et al.*, 2012). Ce n'est que 10 ans plus tard que les sirtuines ont été identifiées comme ayant une activité de désacétylation de protéines. Cette activité mène notamment à une hypoacétylation des histones, expliquant le phénomène de répression de l'expression génique rapporté initialement (Michan & Sinclair, 2007). Par la suite, SIR2 a également été identifiée comme étant un acteur de la longévité chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, une copie supplémentaire du gène *SIR2* permet d'augmenter de 50% la durée de vie répllicative des levures, tandis qu'une délétion du gène réduit leur longévité. Suite à cette découverte, de nombreuses recherches ont été menées afin d'évaluer l'impact de SIR2, ou de ses homologues, sur la longévité de divers organismes tels que le ver *Caenorhabditis elegans* ou la drosophile (Haigis & Guarente, 2006).

b) Généralités

À ce jour, 7 sirtuines (SIRT) mammaliennes ont été caractérisées. Elles sont réparties en 4 classes qui ont été déterminées en fonction de la conservation phylogénétique du cœur catalytique de l'enzyme, lequel est composé d'approximativement 250 acides aminés (Schwer & Verdin, 2008). Bien que les sirtuines soient des enzymes fortement conservées du point de vue de leur fonction et de leur structure, certaines d'entre elles ne possèdent pas d'activité de désacétylation, comme initialement rapporté. En effet, certaines sirtuines présentent une activité de mono-adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation, de démalonylation ou encore de désuccinylation (Houtkooper *et al.*, 2012 ; Vassilopoulos *et al.*, 2011). Cependant, quelle que soit leur activité enzymatique, les sirtuines sont dépendantes du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) pour développer leur activité (Liu et Zhuang 2015). De plus, les sirtuines se différencient par leur poids moléculaire, ainsi que par leur localisation subcellulaire et leur expression tissulaire (Schwer & Verdin, 2008). Les caractéristiques de chaque sirtuine sont reprises dans le Tableau 1.

Tableau 1. Classification, poids moléculaire, activité enzymatique, localisation subcellulaire et tissulaire des 7 sirtuines mammaliennes (Nogueiras *et al.*, 2012 ; Schwer & Verdin, 2008).

Sirtuine	Classe	Localisation subcellulaire	Poids moléculaire	Localisation tissulaire	Activité enzymatique
SIRT1	I	Nucléaire et cytoplasmique	62 kDa	Ubiquitaire	Déacétylation
SIRT2	I	Nucléaire et cytoplasmique	41 kDa	Ubiquitaire	Déacétylation
SIRT3	I	Mitochondriale (et nucléaire)	28 kDa (et 44 kDa)	Ubiquitaire	Déacétylation

				Fortement exprimée dans les reins	
SIRT4	II	Mitochondriale	35 kDa	Reins, muscles, testicules et foie	ADP- ribosylation
SIRT5	III	Mitochondriale	34 kDa	Ubiquitaire	Faible taux de déacétylation
SIRT6	IV	Nucléaire	39 kDa	Ubiquitaire	ADP- ribosylation
SIRT7	IV	Nucléolaire	45 kDa	Reins, cerveau, tissu adipeux blanc, foie et poumons	Inconnue

Certaines sirtuines possèdent également des variants d'épissage ou une localisation subcellulaire variable en fonction des stress cellulaires. C'est notamment le cas des SIRT1/3. Concernant SIRT1, sa localisation peut varier entre compartiments nucléaire et cytoplasmique, avec une localisation principalement nucléaire durant le stress oxydatif par exemple. Ces variations de localisation sont possibles grâce à la présence de deux sites d'import nucléaire (NLS, « *nuclear localization sequence* ») et deux sites d'export nucléaire (NES, « *nuclear export sequence* ») (Figure 6). De plus, ces variations de localisation sont médiées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la SUMOylation, la transnitrosylation ou encore la méthylation. Ces modifications sont apportées par des enzymes, lesquelles sont activées en fonction de l'état cellulaire (Flick & Bernhard, 2012).

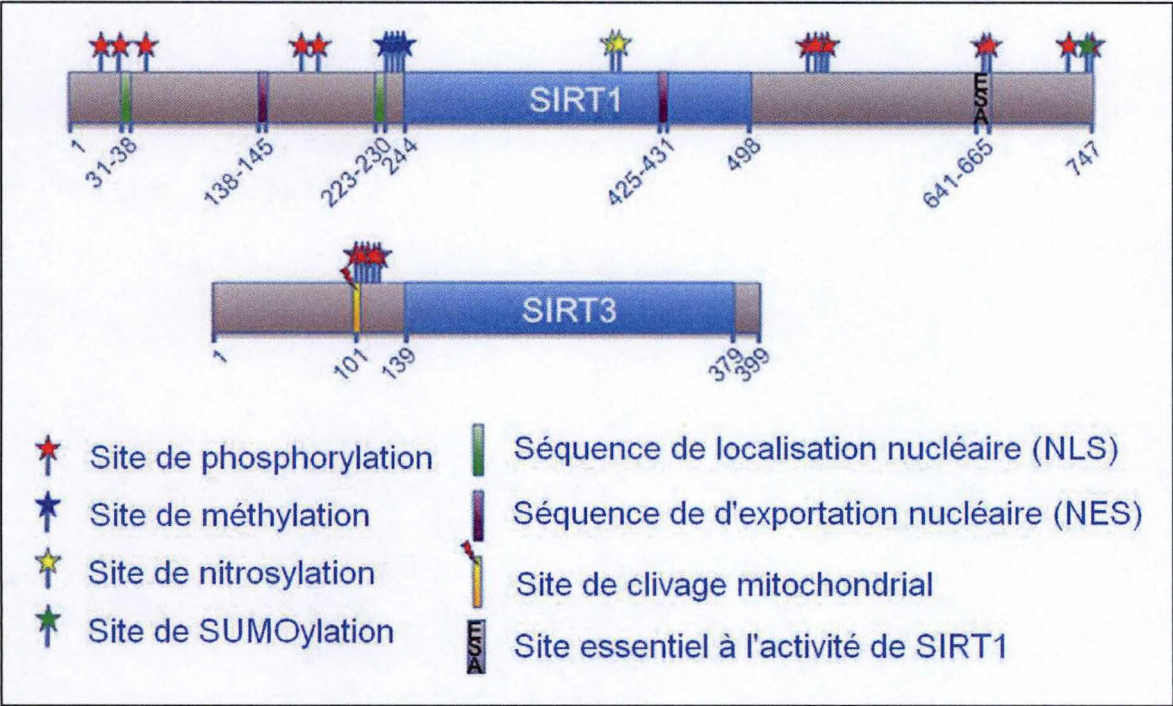


Figure 6. Sites des diverses modifications post-traductionnelles pouvant être apportées aux SIRT1/3, des NLS et NES de SIRT1 et du clivage mitochondrial de SIRT3 (Flick & Bernhard, 2012).

Concernant SIRT3, certaines différences existent entre l'être humain et la souris. Tout d'abord, il existe deux formes de la protéine humaine. La première est une forme longue de 44 kDa tandis que la seconde est une forme courte de 28 kDa. La forme longue de SIRT3 possède un signal d'importation mitochondriale, lequel est une séquence de 142 acides aminés qui est clivée dans la matrice après l'importation (Figure 6). Ce clivage génère alors la forme courte de SIRT3, laquelle est active d'un point de vue enzymatique dans la mitochondrie (Bao *et al.*, 2010). Chez la souris (Figure 7), il existe deux variants d'épissage, contenant trois sites différents d'initiation de la transcription. Les deux premiers sites codent pour deux longs ARNm, menant à la transcription de deux isoformes longues de SIRT3, tandis que le troisième site code pour une isoforme courte (Cooper *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2010). Les deux isoformes longues possèdent un site d'importation mitochondrial qui est proche du site de clivage protéolytique. Elles agissent donc selon le même modèle que la SIRT3 humaine : elles sont adressées à la mitochondrie par la séquence d'importation qui est alors clivée (Cooper *et al.*, 2009). Une fois clivées, les deux isoformes longues possèdent un poids moléculaire similaire à celui de l'isoforme courte (28 kDa). Pour ce qui est de cette dernière, elle a initialement été décrite comme étant mitochondriale. Cependant, cette isoforme ne possède aucune séquence d'import mitochondrial lui permettant d'acquérir cette localisation. Le mécanisme sous-jacent doit donc encore être investigué (Bao *et al.*, 2010 ; Cooper *et al.*, 2009).

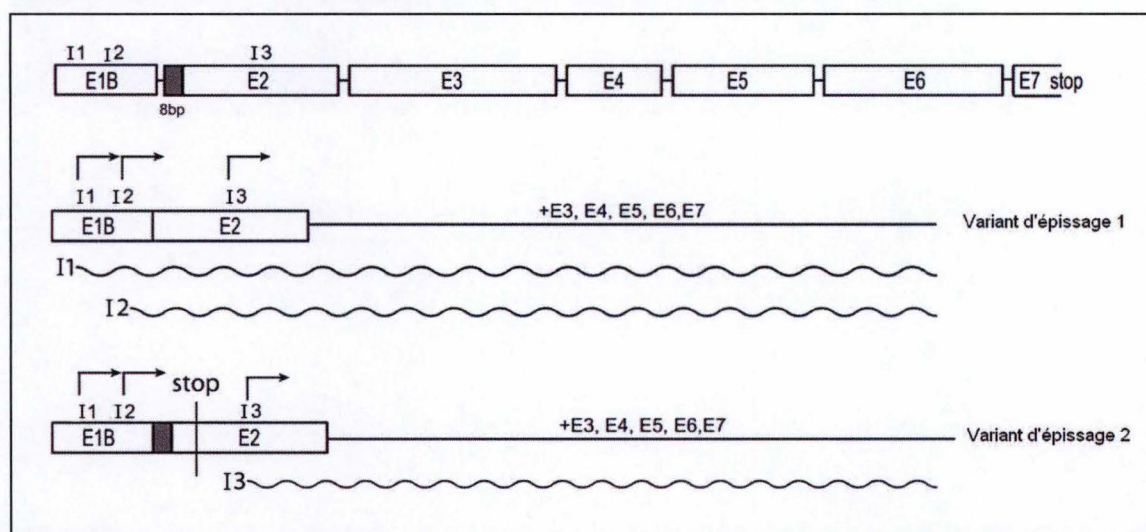


Figure 7. Variants d'épissage de l'enzyme SIRT3. I1 et I2, les deux isoformes longues de SIRT3, et I3, l'isoforme courte. E : Exon.

Finalement, les formes de SIRT3 humaine et murine ont également été décrites comme étant nucléaires. En effet, la forme longue de SIRT3 humaine a été caractérisée comme étant capable de désacétyler des histones et de favoriser la transcription de certains gènes (Iwahara *et al.*, 2012). De même, chez la souris, les formes longues de SIRT3 ont été associées à une localisation nucléaire lorsqu'elles étaient co-exprimées avec SIRT5. De plus, lorsque leur localisation est nucléaire, les SIRT3 ont démontré une activité enzymatique (Nakamura *et al.*, 2008).

c) Activité enzymatique

Les sirtuines sont des enzymes dépendantes du NAD^+ pour exercer leur activité catalytique de désacétylation de lysines. Après être entrés dans le site catalytique, la protéine-substrat et le NAD^+ se lient ensemble. La première étape de la catalyse consiste alors en une attaque nucléophile de l'oxygène du groupement acétyle sur le carbone 1' du nicotinamide

ribose du NAD⁺. Le nicotinamide est alors libéré et un intermédiaire α -1'-O-alkylamidate chargé positivement est formé. Les étapes suivantes, encore peu décrites, vont conduire à la désacétylation de la lysine cible et la formation de O-acétyl-ADP ribose (O-AADPr) (Figure 8) (Avalos *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2008).

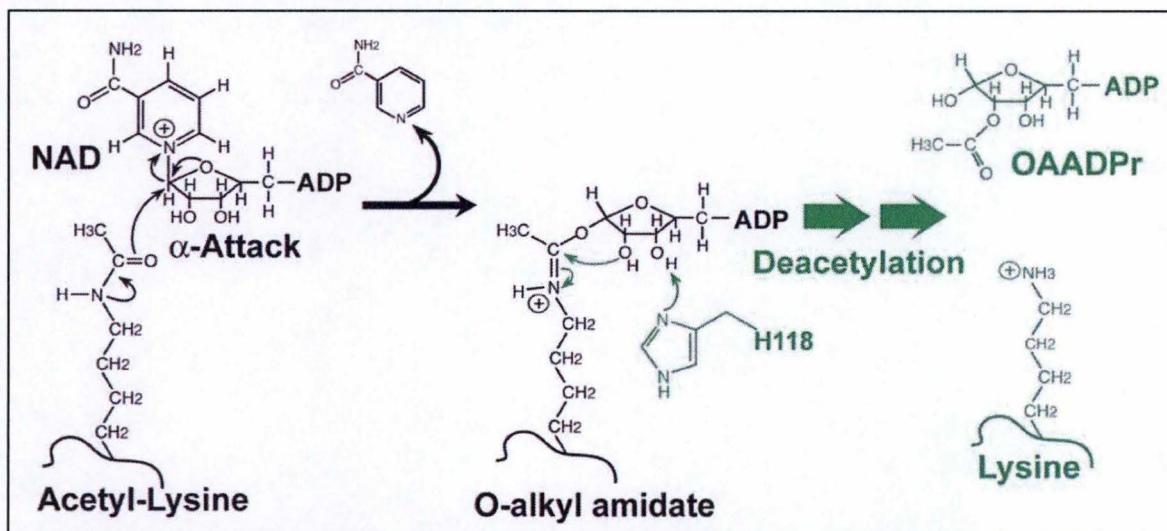


Figure 8. Mécanisme d'action de la désacétylation de lysines acétylées par les sirtuines (Avalos *et al.*, 2005).

III.2. Régulation des sirtuines 1 et 3

À ce jour, la sirtuine la plus étudiée est SIRT1. De ce fait, les divers mécanismes de sa régulation sont bien décrits, alors qu'il subsiste de nombreuses inconnues à ce sujet pour les autres sirtuines. De par leur activité catalytique, les sirtuines ont été décrites comme étant des « senseurs de l'énergie ». En effet, leur expression et leur activité sont augmentées lors des états de stress et inhibées lorsqu'une quantité importante d'énergie est présente dans la cellule (Houtkooper *et al.*, 2012). Par exemple, les expressions et activités des SIRT1/3 ont été décrites comme étant augmentées durant la restriction calorique (Giralt & Villarroya, 2012 ; Kume *et al.*, 2013). Les acteurs les plus fréquemment décrits dans le cadre de la régulation de SIRT1/3 sont cités dans les paragraphes suivants. Toutefois, il est important de noter que cette liste est non-exhaustive.

a) Régulation de la transcription

Les principaux acteurs permettant d'augmenter la transcription de *SIRT1* sont : PPAR α/β (« *peroxisome proliferator-activated receptor- α/β* »), CREB (« *cAMP response element-binding* »), FOXO1 (« *Forkhead box O1* ») et E2F1 (Figure 9A). Ces acteurs cellulaires ont notamment été décrits dans la réponse cellulaire au stress oxydatif ou inflammatoire, ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire pour E2F1 (Finkel *et al.*, 2009 ; Houtkooper *et al.*, 2012). De plus, la répression de la transcription de *SIRT1* est principalement médiée par p53 et par ChREBP (« *carbohydrate response element-binding protein* »). Le premier permet de mettre en place les mécanismes d'apoptose suite à un stress trop intense que pour être contrôlé. Le second permet d'arrêter les voies de signalisation lorsque le taux énergétique cellulaire est récupéré (Houtkooper *et al.*, 2012 ; Nogueiras *et al.*, 2012).

En ce qui concerne *SIRT3*, une augmentation de sa transcription médiée par ERR α (« *estrogen-related receptor- α* ») a été décrite. Le facteur ERR α , en association avec PGC1 α (« *peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α* »), aurait la capacité de lier le

promoteur de SIRT3, induisant de ce fait une augmentation de son expression. Celle-ci est par exemple nécessaire au développement du tissu adipeux brun. Par ailleurs, la régulation de la transcription de *SIRT3* est encore fortement méconnue (Houtkooper *et al.*, 2012).

b) Régulation de la traduction

Du point de vue de la régulation de la traduction, l'ARNm de SIRT1 est stabilisé par la protéine HuR (« *Hu-antigen R* »), laquelle s'associe à la région 3'-UTR de l'ARNm de SIRT1 (Figure 9B). Cette augmentation de la stabilité de l'ARNm résulte notamment en une augmentation de la quantité cellulaire de protéines SIRT1. De plus, la protéine HuR voit son affinité pour l'ARNm de SIRT1 réduite lors du stress oxydatif, induisant une diminution de la stabilité de l'ARNm, et par conséquent de sa traduction (Zschoernig & Mahlknecht, 2008).

D'autres acteurs intervenant dans la régulation de la traduction de l'ARNm de SIRT1 en protéines sont les microARNs (miR). Ceux-ci se lient également à la région 3'-UTR et sont connus pour réprimer, à l'aide des complexes RISC, l'expression génique par deux mécanismes différents qui sont : la dégradation de l'ARNm et la répression de la traduction (Gregory *et al.*, 2005). Deux miR ont été identifiés comme étant des inhibiteurs de l'expression de SIRT1 : les miR-34a et -199a. Le miR-34a a été décrit comme étant surexprimé durant un stress génotoxique tandis que le miR-199a est surexprimé en réponse à l'hypoxie, suggérant un rôle important de SIRT1 dans ces deux types de stress cellulaires (Houtkooper *et al.*, 2012 ; Nogueiras *et al.*, 2012).

c) Régulation post-traductionnelle

De nombreuses modifications post-traductionnelles existent afin de modifier l'activité de protéines. Dans le cas de SIRT1, la protéine peut être phosphorylée, SUMOylée, transnitrosylée ou méthylée (Figure 9C). Par exemple, la phosphorylation de SIRT1 par JNK (« *c-jun N-terminal kinase* ») suite à une augmentation du stress oxydatif induit la translocation de SIRT1 dans le noyau et une augmentation de son activité. SIRT1 va alors désacétyler l'histone H3, permettant de ce fait l'augmentation de l'expression de gènes contribuant à la mise en place d'une réponse anti-oxydante (Flick & Bernhard, 2012). Un autre exemple est la désSUMOylation de SIRT1 par SENP (« *sentrin-specific protease* »), induisant une diminution de l'activité de SIRT1 et une augmentation de la mort cellulaire en réponse à un stress génotoxique (Houtkooper *et al.*, 2012).

Bien qu'aucune donnée ne soit encore disponible dans la littérature sur les modifications post-traductionnelles de SIRT3, 6 sites de phosphorylation ont néanmoins été identifiés. Ces sites potentiels de phosphorylation sont proches du site de clivage de l'isoforme longue. De ce fait, il existe de nombreuses hypothèses sur l'implication de la phosphorylation dans le contrôle de l'entrée de SIRT3 dans la mitochondrie, ainsi que le lien potentiel avec son activité. Cependant, aucune d'entre elles n'a encore été validée à ce jour (Flick & Bernhard, 2012).

d) Autres régulations

D'autres mécanismes de régulation sont également mis en place par les cellules. Tout d'abord, il existe une régulation dite « par formation de complexe » (Figure 9D). Il s'agit d'une régulation par interaction d'une protéine avec la protéine SIRT1, menant à une augmentation ou une inhibition de son activité. La seule protéine connue comme permettant une activation de l'activité de SIRT1 par formation d'un complexe est la protéine AROS (« *active regulator of SIRT1* »). *A contrario*, de nombreuses protéines ont été décrites comme formant un complexe inhibiteur avec SIRT1, induisant de ce fait une diminution de l'activité de cette enzyme. Le complexe le plus connu étant le complexe DBC1-SIRT1 (« *deleted in breast cancer 1* »), lequel

est diminué lors d'une restriction calorique et augmenté lors d'un stress génotoxique (Houtkooper *et al.*, 2012).

Un autre mécanisme permettant de réguler l'activité des SIRT1/3 est l'abondance de leur cofacteur, le NAD⁺ (Figure 9D). En effet, un ratio NAD⁺/NADH élevé va favoriser l'activation des SIRT1/3 tandis qu'un ratio faible aura tendance à inhiber leur activité. Par exemple, la restriction calorique va induire une augmentation de ce ratio, favorisant de ce fait l'activité des SIRT1/3 (Houtkooper *et al.*, 2012). Dans ce cadre, le resvératrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbène), une phytoalexine polyphénolique, a également été abondamment étudié. En effet, celui-ci induit une activation de l'AMPK (« AMP-activated protein kinase »), laquelle augmente le ratio NAD⁺/NADH. De plus, certaines études ont également démontré une activation allostérique de SIRT1 par le resvératrol, au niveau du domaine N-terminal de la protéine (Hubbard *et al.*, 2013).

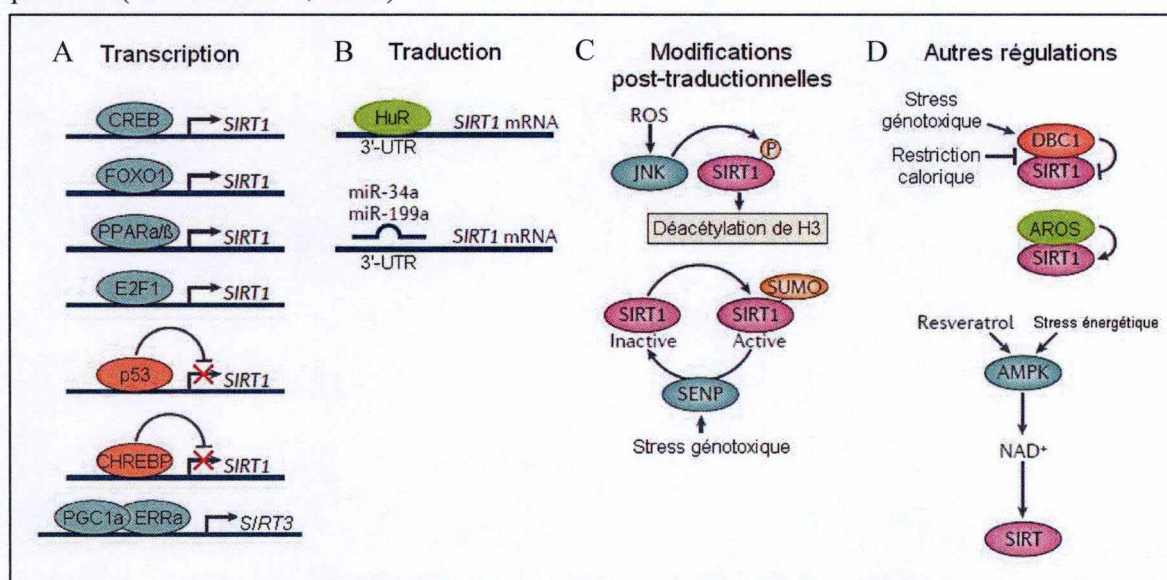


Figure 9. Mécanismes de régulation (A) de la transcription et (B) de la traduction des SIRT1/3, ainsi que les diverses régulations opérées par (C) les modifications post-traductionnelles, (D) la formation de complexes et le statut énergétique de la cellule. Schéma modifié depuis la publication de Houtkooper *et al.* (2012).

III.3. Les fonctions des sirtuines

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été réalisées sur les sirtuines afin d'identifier leurs rôles dans l'organisme. Etant donné l'historique de leur découverte, la première fonction qui a été étudiée a été l'augmentation de l'espérance de vie par les sirtuines. Bien que cette augmentation ait été décrite chez la levure, le ver et la drosophile, une souris surexprimant de façon systémique *SIRT1* ne présente pas une espérance de vie augmentée par rapport à une souris WT (« wild type »). Cependant, il a tout de même été mis en évidence que la surexpression de certaines sirtuines telles que SIRT3 permet de diminuer les pathologies liées à l'âge chez la souris (Sebastián *et al.*, 2012).

Une autre fonction importante identifiée chez les sirtuines est leur rôle dans le métabolisme. En effet, les sirtuines ont une importance capitale dans ce domaine, autant au niveau du métabolisme des lipides et du glucose que des corps cétoniques. De ce fait, les sirtuines sont exprimées dans de nombreux tissus où elles jouent des rôles divers (Nogueiras *et al.*, 2012). Dans un souci de clarté et d'intérêt par rapport à ce travail, les points suivants

n'abordent cependant que les fonctions des SIRT1/3 dans le cadre de l'inflammation et du stress oxydatif, plus particulièrement dans le rein.

a) Inflammation

La SIRT1 est l'une des sirtuines les plus actives dans la lutte contre l'inflammation. La cible la plus importante de SIRT1 dans ce contexte est la sous-unité RelA/p65 de NF- κ B (« *nuclear factor kappa enhancer binding protein* »). SIRT1 peut, par exemple, désacétyler la lysine 310 de RelA/p65, inhibant par conséquent sa translocation dans le noyau. Du fait de cette inhibition, plusieurs cytokines pro-inflammatoires, normalement induites par NF- κ B, ne sont pas exprimées. Les cytokines cibles de ce facteur de transcription au niveau rénal sont, entre autres : l'IL-1 β (« *interleukin-1 β* »), l'IL6, ou encore le TNF- α (« *tumor necrosis factor- α* ») (Gallí *et al.*, 2011).

La cytokine pro-inflammatoire exerçant le plus grand nombre de fonctions dans les cellules épithéliales tubulaires proximales est le TNF- α . En effet, de nombreuses fonctions lui sont attribuées, telles que le contrôle de l'expression et de la synthèse d'autres cytokines, l'activation de plusieurs facteurs de transcription, ou encore l'augmentation de l'expression de certains récepteurs. Par ailleurs, il est également connu que le TNF- α peut présenter une toxicité pour les cellules épithéliales tubulaires proximales. En effet, il semblerait que le TNF- α ait la capacité d'induire la production de ROS (« *reactive oxygen species* »), augmentant de ce fait le stress oxydatif, mais également d'induire l'apoptose ou la nécrose de ces cellules. Finalement, le TNF- α , ainsi que NF- κ B, induisent l'augmentation de l'expression des cytokines IL-1 β et IL6. Ces deux cytokines ont comme principale caractéristique d'accroître l'expression de plusieurs molécules d'adhérence, lesquelles permettent notamment l'extravasation des cellules immunitaires (Navarro-Gonzalez & Mora-Fernandez, 2008).

D'autres fonctions ont également été associées au TNF- α dans d'autres types cellulaires, mais ne sont pas à exclure dans les cellules épithéliales des tubules proximaux. Premièrement, une augmentation de l'acétylation médiée par le TNF- α a été observée au niveau de la lysine 310 de la sous-unité RelA/p65 du facteur de transcription NF- κ B. Cette augmentation de l'acétylation accroît l'activité de NF- κ B, s'opposant ainsi à la désacétylation catalysée par SIRT1 (Zhu *et al.*, 2011). De plus, le TNF- α est également connu pour favoriser le clivage de SIRT1 par la cathepsine B, résultant en l'inactivation de l'enzyme (Dvir-Ginzberg *et al.*, 2011). Les cytokines pro-inflammatoires ont également la capacité d'induire l'expression de chémokines, lesquelles ont pour but d'attirer les cellules immunitaires dans le tissu lésé. L'une des chémokines la plus fréquemment induite par le TNF- α et l'IL-1 β est MCP-1 (« *monocyte chemoattractant protein 1* »). Celle-ci entraîne le recrutement de macrophages dans le tissu rénal qui sont également capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Cette augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires circulantes provoque, entre autres, une augmentation du recrutement des cellules immunitaires, ainsi que l'activation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaires (Akca *et al.*, 2009).

b) Stress oxydatif

SIRT1 permet également de lutter contre le stress oxydatif. En effet, plusieurs études ont montré une accumulation nucléaire de NRF2 (« *nuclear receptor factor 2* ») suite à une activation de SIRT1. NRF2 est un facteur de transcription qui est séquestré dans le cytosol par Keap1. Lors du stress oxydatif, plusieurs kinases comme ERK1/2 (« *extracellular signal-regulated kinase* ») et PKC (« *protein kinase C* ») phosphorylent NRF2, induisant la disruption du complexe NRF2/Keap1, ainsi que sa translocation dans le noyau (Huang *et al.*, 2002). NRF2 va alors induire l'expression d'acteurs permettant de lutter contre le stress oxydant tels que

l'HO-1 (« *heme oxygenase 1* ») et la SOD1 (« *superoxide dismutase 1* »). Bien que l'augmentation de la translocation et de l'activité de NRF2 induite par SIRT1 ait été observée, les mécanismes sous-jacents doivent encore être élucidés (Tamaki *et al.*, 2014).

Enfin, SIRT1 et SIRT3 permettent également de lutter contre le stress oxydatif de façon concomitante, par une augmentation de la biogenèse mitochondriale médiée par PGC1 α . Dans ce cadre, SIRT1 désacétyle PGC1 α , induisant dès lors l'augmentation de son activité et de son accumulation nucléaire. Cette désacétylation a notamment été observée dans le tissu rénal de rats ayant subi un épisode d'ischémie/reperfusion (Funk & Schnellmann, 2013). PGC1 α est un régulateur transcriptionnel qui est l'acteur principal de l'augmentation de la biogenèse mitochondriale, ainsi que de la détoxification des ROS (Rasouri *et al.*, 2007). En effet, le co-activateur PGC1 α régule aussi bien la biogenèse des mitochondries, que l'augmentation de l'expression des enzymes détoxifiantes, telles que HO-1 et SOD2. Par ailleurs, l'HO-1 permet la détoxification de l'hème par oxydoréduction, mais induit également la transcription de SIRT1. Le mécanisme permettant d'expliquer l'augmentation de l'expression de SIRT1 suite à une surexpression de l'HO-1 n'a cependant pas encore été élucidé (Singh *et al.*, 2016).

Lors de l'augmentation de la biogenèse mitochondriale, l'expression de SIRT3 est également augmentée. De par sa localisation, SIRT3 est le principal régulateur du niveau d'acétylation des protéines mitochondriales. De ce fait, il est considéré comme étant un acteur majeur de l'atténuation du stress oxydatif, directement au niveau mitochondrial. En effet, l'activité de la mitochondrie induit, de façon intrinsèque, le stress oxydatif en produisant des ROS comme le radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), lesquels sont des sous-produits de la chaîne de transfert d'électrons. La première enzyme de détoxification des ROS au niveau de la matrice mitochondriale est la SOD2, laquelle peut être activée par SIRT3. En effet, la désacétylation de SOD2 permet d'augmenter son activité, limitant ainsi le stress oxydant (Bause & Haigis, 2013). De plus, une délétion du gène *SIRT3* peut induire une diminution de l'expression de SOD2, permettant d'émettre l'hypothèse que l'expression de SOD2 soit dépendante de l'expression de SIRT3 (Koyama *et al.*, 2011)

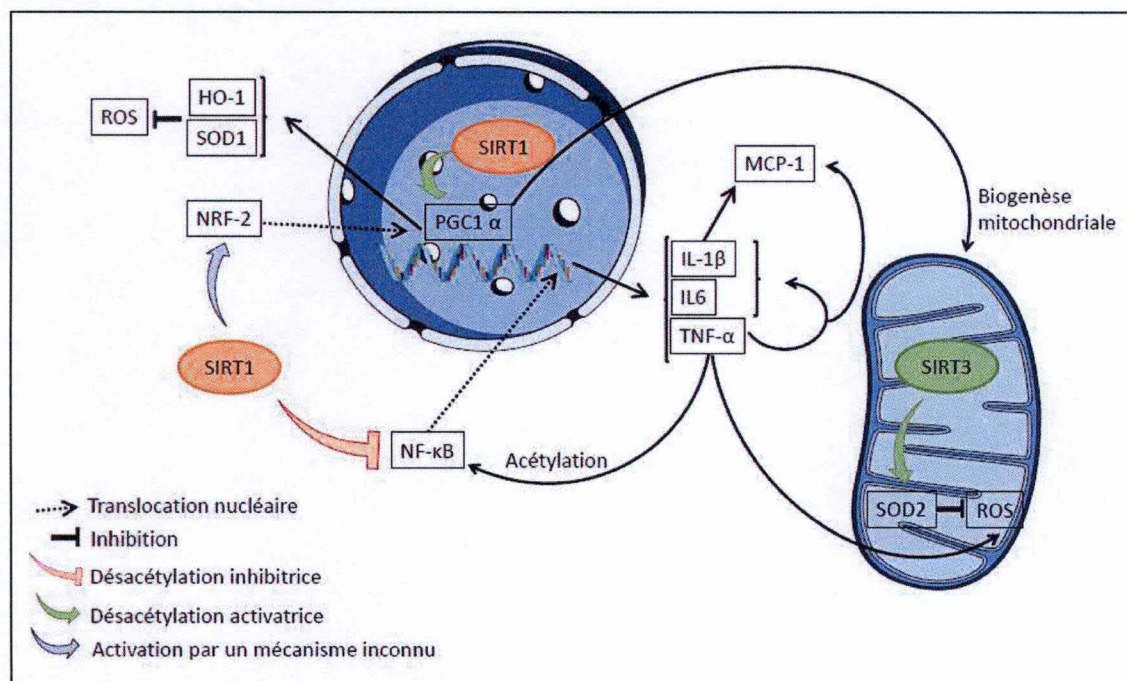


Figure 10. Les fonctions des SIRT1/3 dans le cadre de l'inflammation et de la réponse anti-oxydante.

III.4. Modèles expérimentaux

Durant les dernières années, de nombreuses études ont été réalisées sur les sirtuines, et plus particulièrement sur leur capacité à protéger l'organisme contre la néphropathie aiguë induite par une septicémie (Zhao *et al.*, 2016), induite suite à une exposition au cisplatine (Morigi *et al.*, 2015), ou encore suite à un épisode d'ischémie-reperfusion (Hasegawa *et al.*, 2010). De ce fait, des modèles de surexpression et de délétion de gènes ont été mis en place afin d'étudier l'implication des SIRT1/3 *in vivo*. Dans ce cadre, des souris *SIRT1*^{-/-}, *SIRT1*^{+/+}, *SIRT3*^{+/+} et *SIRT3*^{-/-} ont été générés (Finkel *et al.*, 2009).

Les premiers essais réalisés pour obtenir des souris déficientes pour le gène *SIRT1* ont tous échoués. En effet, approximativement 10% des souris étaient capables de se développer normalement durant la vie fœtale et étaient encore vivantes au terme de la gestation. De plus, à la naissance, ces souris présentaient une hydrocéphalie ainsi que des dommages osseux, rétiens et cardiaques, provoquant leur mort dans les quelques jours qui suivaient la naissance (Finkel *et al.*, 2009). Dès lors, la délétion du gène *SIRT1* chez des souris a été obtenue après leur développement avec un système Cre/lox inducible. Dans ce cas, la délétion du gène *SIRT1* était induite au début du protocole, permettant donc un développement normal des souris (Gao *et al.*, 2014). En ce qui concerne les souris déficientes pour le gène *SIRT3*, celles-ci présentent un développement normal. Les troubles observés sont principalement une augmentation de l'acétylation des protéines mitochondriales, des changements d'activité des principales cibles de SIRT3 et une diminution du niveau d'ATP intracellulaire. Toutefois, ces modifications n'affectent pas la survie des animaux (Finkel *et al.*, 2009). Des souris *SIRT3*^{-/-} ont notamment été utilisées dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë induite par le cisplatine. Dans ce modèle, les souris déficientes pour le gène *SIRT3* présentaient une susceptibilité au cisplatine augmentée par rapport aux souris contrôle (Morigi *et al.*, 2015).

Les souris au génotype *SIRT1*^{+/+} et *SIRT3*^{+/+} ne présentent aucun phénotype particulier. Ces souris sont principalement utilisées dans le but d'étudier la surexpression des sirtuines dans le cadre de pathologies telles que dans des modèles de néphropathie ou de dommages cardiaques. Parmi ces études, l'équipe de Hasegawa (2010) a utilisé des souris transgéniques surexprimant *SIRT1* dans l'épithélium tubulaire du rein dans le but d'étudier une néphropathie induite par le cisplatine ou par ischémie-reperfusion. Dans ces deux modèles, la surexpression de *SIRT1* induit une protection contre les dommages rénaux aigus, avec une amélioration des paramètres de l'insuffisance rénale aiguë, telle que la créatinine et l'urée plasmatiques (Hasegawa *et al.*, 2010).

A contrario, aucune étude sur l'insuffisance rénale aiguë chez des souris surexprimant *SIRT3* n'a encore été menée à ce jour. Cependant, plusieurs études utilisent une surexpression pharmacologique de *SIRT3* plutôt que des souris transgéniques. C'est par exemple le cas de l'étude de Morigi *et al.* (2015), lesquels ont étudié l'insuffisance rénale aiguë induite par du cisplatine chez des souris traitées à l'aide d'AICAR. De même, certaines études se penchent sur une augmentation pharmacologique de l'expression de *SIRT1* avec du resvératrol. Dans l'étude de Kim *et al.* (2011), le resvératrol permet notamment de diminuer la susceptibilité des souris au cisplatine *via* une augmentation de l'expression de SIRT1.

IV. Objectifs de ce mémoire

Suite aux nombreux effets protecteurs des SIRT1/3 décrits dans la littérature dans divers modèles de stress rénal aigu, il a semblé intéressant d'étudier ces deux enzymes dans un modèle de NAA. En effet, bien que la protection conférée par SIRT1 ait été reportée dans des modèles

d'insuffisance rénale induite par le cisplatine (Morigi *et al.*, 2015), ou par ischémie-reperfusion (Xu *et al.*, 2016), aucune étude n'a encore investigué les rôles des SIRT1/3 dans un modèle de NAA. De même, bien que l'impact d'une délétion du gène *SIRT3* ait été évalué dans un modèle d'insuffisance rénale induite au cisplatine (Morigi *et al.*, 2015), aucune étude sur la NAA n'a encore recherché l'implication potentielle de SIRT3 dans ce modèle. Enfin, l'étude de l'expression des SIRT1/3 dans un modèle *in vivo* de NAA, ou dans un modèle cellulaire *in vitro* d'intoxication aux AA, n'a encore jamais été réalisée.

Nous avons donc décidé de baser notre projet sur l'évolution des SIRT1/3 durant la phase d'insuffisance rénale aigüe observée dans un modèle de NAA induite chez des souris C57Bl/6. De plus, afin de compléter notre étude sur le rôle éventuel des SIRT1/3 dans l'intoxication des cellules épithéliales tubulaires proximales, un second modèle a été mis en place. Il s'agit d'un modèle *in vitro* de cellules épithéliales tubulaires proximales (cellules HK-2) provenant d'un rein humain exposées aux AA-I.

En conclusion, le but de ce mémoire est de caractériser l'évolution de l'expression des SIRT1/3 dans un modèle murin de NAA et dans un modèle d'intoxication de cellules HK-2 par les AA.

Matériel et méthodes

I. Expérimentations *in vivo*

I.1. Animaux

Toutes les expérimentations décrites dans cette étude ont été approuvées par la Commission d'éthique en expérimentation animale de l'Université de Namur. 56 souris mâles C57Bl/6J (Janvier, France) âgées de 8 semaines ont été intégrées à l'étude et réparties aléatoirement dans 7 groupes expérimentaux. Le milieu de vie des souris a été quotidiennement contrôlé durant toute la durée du protocole, afin de garantir une température et un taux d'humidité constants dans la pièce d'hébergement. De plus, un cycle jour/nuit 12h/12h a été appliqué. Les souris ont eu libre accès à la nourriture standard adaptée aux rongeurs (SAFE A03, France) et à l'eau courante, lesquelles étaient renouvelées tous les deux jours.

I.2. Traitement

Une solution stock d'AA a été préparée en diluant 1 mg d'acide aristolochique I (Sigma-Aldrich, États-Unis) dans 1 ml de phosphate buffer saline (PBS). Afin de solubiliser les AA, la solution stock a ensuite été chauffée à 60°C dans un bain-marie pendant 40 minutes et a été fréquemment vortexée. La solution stock a ensuite été conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière durant toute la durée du protocole. Chaque jour, la solution d'AA à injecter a été fraîchement préparée en diluant la solution stock (1:2,86) dans du NaCl stérile 0,9%. D'autre part, la solution contrôle a été obtenue en diluant du PBS (1:2,86) dans du NaCl stérile 0,9%. Les solutions ont ensuite été administrées par injection intrapéritonéale (i.p.) à raison de 10 mg/kg de poids corporel, les souris étant pesées chaque jour afin d'ajuster le dosage.

Tableau 2. Traitement administré à chaque groupe expérimental.

	Contrôle (n=8)	AA (n=48)
Solution injectée par voie i.p.	PBS dilué 1:2,86 dans du NaCl stérile 0,9%	AA-I (solution stock) dilué 1:2,86 dans du NaCl stérile 0,9%
Dose injectée	3,5 mg/kg	3,5 mg/kg
Nombre de souris	Groupe contrôle (n=8)	Groupe H12 (n=8) Groupe H24 (n=8) Groupe H48 (n=8) Groupe H72 (n=8) Groupe H96 (n=8) Groupe J10 (n=8)

I.3. Récolte des échantillons

Dans le but de récolter des échantillons d'urine permettant les analyses ultérieures, les souris ont été placées en cage métabolique (Figure 11) durant les vingt-quatre heures précédant leur euthanasie. Ces cages permettent de séparer l'urine des excréments, ainsi que d'obtenir les données relatives à la consommation journalière d'eau et de nourriture. Afin d'éviter l'évaporation de l'urine, 1 ml de paraffine liquide (VWR, Belgique) a été disposé dans le réceptacle à urine. Après avoir été récoltée, l'urine a été centrifugée durant 10 minutes à 2500g

afin d'éliminer la paraffine liquide et les impuretés, elle a ensuite été aliquotée et conservée à -80°C pour les expériences ultérieures.

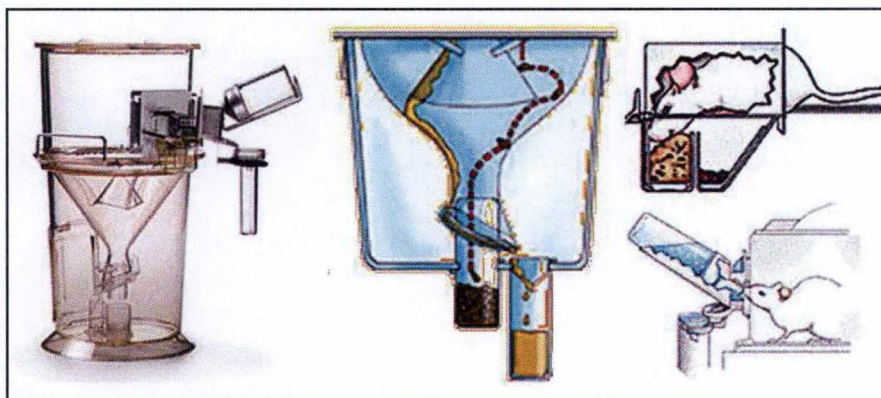


Figure 11. Agencement d'une cage métabolique.

À la sortie de cage métabolique, les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de Kétamine (80 mg/kg Nimatek® Eurovet Animal Health, Pays-Bas) et de Médétomidine (0,5 mg/kg Domitor® Orion Pharma, Finlande) avant d'être euthanasiées. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et une laparotomie a été réalisée afin de prélever les reins. Après avoir été pesés, un rein a été coupé en 2 selon l'axe longitudinal tandis que le second a été coupé longitudinalement et transversalement afin d'obtenir 4 parties. La première moitié du premier rein a été fixée dans du Bouin-alcool (Acide picrique 1%, Sigma-Aldrich, États-Unis – Formol 40% et Éthanol 95%, Univar, Belgique – Acide acétique, VWR, Belgique – Eau distillée) afin de réaliser des coupes histologiques et de procéder à des analyses en immunohistochimie. La seconde même moitié du rein a été homogénéisée dans le but de procéder à une immunoprécipitation de mitochondries (voir point II.1). Les quatre parties du second rein ont été congelées directement dans l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C pour les analyses ultérieures. Toutes les manipulations ont été réalisées en conditions « *RNA^{se}-free* ».

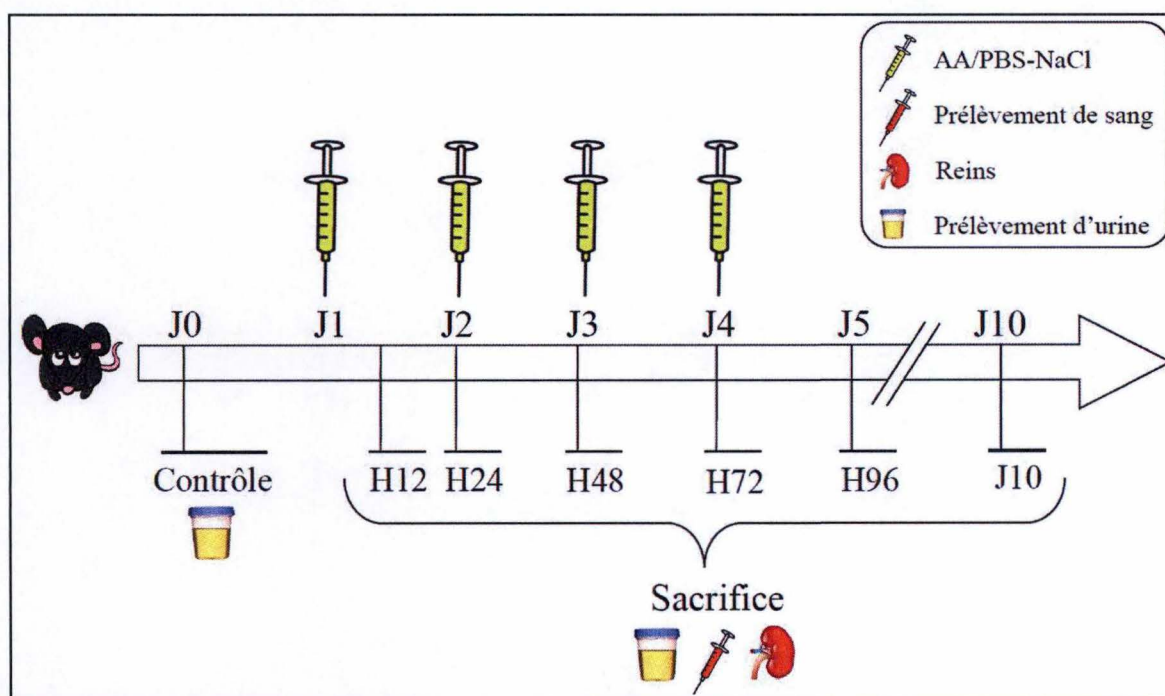


Figure 12. Schéma du protocole *in vivo*.

II. Analyses sur les échantillons récoltés lors du protocole *in vivo*

II.1. Immunoprécipitation de mitochondries

Les mitochondries rénales ont été immunoprécipitées grâce au kit « *Mitochondria Isolation kit* » pour tissus murins (MACS Miltenyi Biotec, Pays-Bas). Comme conseillé, l'entièreté du protocole a été réalisée à une température de 4°C. Tout d'abord, juste après avoir été prélevé, un demi-rein a été homogénéisé et les cellules lysées à l'aide d'un potter électrique (Heidolph, Allemagne) et de 750 µl du tampon de lyse fourni par le kit (Figure 4A). L'homogénat a ensuite été centrifugé durant 10 minutes à 9300 g afin de culoter les débris cellulaires et tissulaires. Après centrifugation, le surnageant a été transféré dans un falcon et porté à un volume de 10 ml avec le tampon de séparation dilué 10x dans de l'eau distillée. Afin de récolter uniquement les mitochondries présentes dans le surnageant, 50 µl d'anticorps anti-TOM22 liés à des billes magnétiques ont été ajoutés (Figure 4B). Après une incubation d'une durée d'une heure sur roue tournante, permettant la fixation de l'anticorps à sa cible, les échantillons ont été déposés sur une colonne disposée dans un champ magnétique (Figure 4C). Ce dernier a permis de retenir les billes magnétiques, et donc les mitochondries, dans la colonne. Finalement, la colonne a été lavée avec 9 ml de tampon de séparation avant d'être sortie du champ magnétique afin de récolter les mitochondries dans 1,5 ml de tampon de séparation (Figure 4D). L'échantillon obtenu a ensuite été centrifugé 3 minutes à 13 000 g afin de culoter les mitochondries, permettant ainsi leur resuspension dans 100 µl de tampon de lyse DLA-mito (Urée 7 M, Merck, Allemagne – Thiourée 2 M, CHAPS 1%, et ASB14 1%, Sigma-Aldrich, États-Unis – Tris 30 mM, Invitrogen, États-Unis – SDS 1%, Panreac, Espagne). Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C.

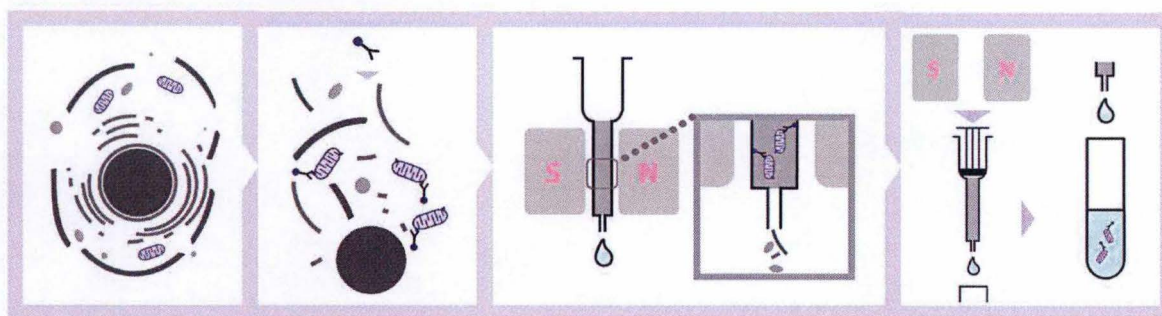


Figure 13. Schéma du protocole d'immunoprécipitation de mitochondries. (A) Cellule lysée, (B) Fixation de l'anticorps anti-TOM22 aux mitochondries, (C) Passage de l'échantillon sur une colonne placée dans un champ magnétique (noté S et N) et (D) Récolte des mitochondries de l'échantillon (« *Mitochondria Isolation kit* », MACS Miltenyi Biotec, Pays-Bas).

II.2. Histologie et immunohistochimie

a) Préparation des coupes histologiques

Comme expliqué précédemment, un demi-rein a été disposé dans une cassette histologique et plongé directement après prélèvement dans du Bouin-alcool (Acide picrique 1%, Sigma-Aldrich, États-Unis – Formol 40% et Éthanol 95%, Univar, Belgique – Acide acétique, VWR, Belgique – Eau distillée) durant 48 heures afin de fixer les tissus. Ceux-ci ont ensuite été immergés dans de l'éthanol renouvelé 3 fois en 24 heures puis dans du butanol, également renouvelé 3 fois en 24 heures, afin d'être déshydratés. Après ces étapes, les tissus ont été immergés dans trois bains successifs de paraffine liquide à une température de 60°C, d'une durée de 24 heures chacun. Finalement, les organes ont été coulés dans des blocs de

paraffine fraîche liquide. Une fois les blocs solidifiés, des sections d'une épaisseur de 5 µm ont été découpées à l'aide d'un microtome (Leica, RM2155, Allemagne). Chaque section a ensuite été déposée à la surface d'une goutte d'eau, elle-même placée sur une lame silanée (3-aminopropyl trimethoxysilane 98%, Sigma-Aldrich, États-Unis) qui a alors été disposée sur une plaque chauffante (35°C). Une fois l'eau évaporée, les lames peuvent être conservées telles quelles jusqu'aux analyses. Toutefois, avant de colorer les coupes, ou de les analyser en immunohistochimie, il est nécessaire de déparaffiner le tissu et de le réhydrater. Pour ce faire, les lames ont été plongées dans deux bains de toluène d'une durée de 3 minutes chacun puis ont été rapidement immergées dans trois bains successifs d'éthanol de 3 minutes chacun. Pour finir, les lames ont été lavées à l'eau courante pendant 10 minutes puis ont été conservées dans de l'eau distillée avant d'être colorées ou analysées en immunohistochimie.

b) Coloration PAS (Periodic Acid Shift)

Afin d'observer la structure histologique des coupes de rein, une coloration PAS a été utilisée. Celle-ci met en évidence les glycoprotéines, les protéines et les carbohydrates, permettant ainsi une observation aisée des structures histologiques. De plus, l'hémalum (Hematoxyline Mayer, J.T. Baker, Pays-Bas) a permis de mettre en évidence le noyau en violet et le bleu de luxol (Luxol fast blue, Alfa Aesar®, Allemagne, 0,1% dans de l'alcool 95°) a été utilisé afin de contre-colorer les coupes en marquant le cytoplasme en bleu. Afin de réaliser ces colorations, les coupes histologiques ont suivi les étapes suivantes :

- 8 minutes – Acide périodique 1% (VWR, Belgique)
- Rinçage à l'eau distillée
- 1 minute – PAS (Parasilin 1%, Sigma-Aldrich, États-Unis)
- Rinçage à l'eau distillée
- 10 minutes – Eau courante
- Rinçage à l'eau distillée
- 2 minutes – Hémalum
- Rinçage à l'eau distillée
- 5 minutes – Eau courante
- Rinçage à l'eau distillée
- 10 secondes – Bleu de luxol

Finalement, les lames ont été plongées dans 3 bains d'éthanol, un de butanol et deux de toluène. Ensuite, des lames couvre-objet ont été disposées sur les tissus qui ont été analysés au microscope (Leica, Allemagne).

c) Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique permettant de mettre en évidence un antigène particulier présent dans une coupe histologique. Une fois les lames déparaffinées comme explicité plus haut, la première étape consiste à démasquer les sites antigéniques avec du tampon citrate (0,01M, pH 6,2, obtenu en diluant 21g d'acide citrique dans 1 litre d'eau distillée, Sigma-Aldrich, États-Unis) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après un bain d'eau distillée et un autre de PBS, les lames sont incubées durant 15 minutes dans un bain de peroxyde d'hydrogène (Merck, Allemagne) afin d'inhiber les peroxydases endogènes qui pourraient interférer avec l'agent de révélation. Après cela, les lames sont rincées au PBS et les étapes suivantes sont réalisées :

- 15 minutes – 30 µl d'avidine (1:100 Vector Laboratories Inc, États-Unis)
- Rinçage au PBS
- 15 minutes – 30 µl de biotine (1:100 Vector Laboratories Inc, États-Unis)

- Rinçage au PBS
- 30 minutes – 30 µl de caséine (Vector Laboratories Inc, États-Unis)
- 30 µl d'anticorps primaire PCNA (dilution 1:50, Abcam, États-Unis) *over-night* à 4°C
- Rinçage au PBS
- 30 µl d'anticorps secondaire Signal Boost Rabbit (Cell Signaling, États-Unis) durant 30 minutes à température ambiante
- Rinçage au PBS
- Incubation DAB

Ensuite, une coloration classique a été réalisée avec de l'hémalum (Hematoxyline Mayer, J.T. Baker, Pays-Bas) afin de mettre les noyaux en évidence et avec du bleu de luxol (Luxol fast blue, Alfa Aesar®, Allemagne, 0,1% dans de l'alcool 95°) afin de marquer le cytoplasme. Finalement, des lames couvre-objet ont été disposées sur les tissus qui ont ensuite été analysés au microscope (Leica, Allemagne).

Afin d'analyser les résultats obtenus, chaque lame a été observée au microscope optique au grossissement 400x et 10 champs ont été observés pour chaque lame. Les analyses ont été réalisées en double-aveugle à l'aide du programme informatique Image J (Macbiophotonics, États-Unis). L'évaluation du marquage PCNA a ensuite été réalisée de la façon suivante :

$$x = \frac{\text{Nombre de noyaux positifs au PCNA}}{\text{Nombre total de noyaux}} \times 100$$

II.3. Dosages plasmatiques

a) Urée plasmatique

La concentration plasmatique de l'urée a été mesurée à l'aide du « Quanticrom™ Urea assay kit » (DIUR-500, Bioassay systems, États-Unis). Pour ce faire, les échantillons plasmatiques ont été dilués 10 fois, excepté pour le jour 10 où ils ont été dilués 20 fois, dans de l'eau distillée. De plus, des standards ayant une concentration connue ont été préparés. 5 µl de chaque échantillon et des standards ont ensuite été déposés sur une plaque multi-puits (Greiner Bio-One, Allemagne) ainsi que 200 µl de réactif. Une incubation de 20 minutes à température ambiante a alors été respectée afin de permettre au réactif chromogénique de réagir avec l'urée et de former un complexe coloré. Finalement, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 520 nm grâce à un spectrophotomètre (Versa Max Micro Plate Reader, Molecular Devices, États-Unis) et les concentrations plasmatiques en urée (mg/dl) ont été calculées grâce à la courbe standard.

b) Créatinine plasmatique

La créatinine plasmatique a été mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (binary HPLC pomp, Waters, États-Unis) en collaboration avec l'Unité de recherche en Néphrologie expérimentale à l'ULB (Erasmus, Belgique). Le principe de cette technique est d'utiliser une colonne qui sépare les protéines d'un échantillon de plasma en fonction de leur charge et de leur hydrophobicité, permettant ainsi de calculer la concentration d'une molécule d'intérêt.

II.4. Dosages urinaires

a) Créatinine urinaire

Afin de déterminer les concentrations en créatinine urinaire, un kit de dosage colorimétrique (Enzo Life Technology, États-Unis) a été utilisé. Pour ce faire, les échantillons d'urine ont été dilués (1:20) dans de l'eau distillée et des échantillons standards de concentration connue ont été préparés. Les échantillons et les standards ont ensuite été déposés sur une plaque multi-puits (Greiner Bio-One, Allemagne) et le réactif de détection a été ajouté. Ce dernier contient de l'acide picrique qui réagit avec la créatinine, menant ainsi à un changement de couleur de la solution. Finalement, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 490 nm grâce à un spectrophotomètre (Versa Max Micro Plate Reader, Molecular Devices, États-Unis). La courbe standard a permis de calculer les concentrations urinaires de créatinine des échantillons urinaires (mg/dl).

b) Osmolarité urinaire

Les échantillons d'urine ont été dilués (1:10) avec de l'eau distillée. Un osmomètre (Fiske®210 Micro-Osmometer, États-Unis) a ensuite été utilisé afin de déterminer l'osmolarité urinaire (mOsm/l). Cet appareil analyse le point de congélation d'une solution, lequel varie en fonction du nombre de particules présentes dans l'échantillon. Tout d'abord, l'échantillon est refroidi et sa cristallisation est induite par une impulsion mécanique. Après cela, l'échantillon est réchauffé jusqu'à ce qu'un équilibre eau-glace soit atteint. La température nécessaire pour obtenir la congélation de l'échantillon diminue avec l'augmentation de l'osmolarité.

c) Protéinurie

Afin de déterminer la concentration urinaire en protéines, les échantillons d'urine ont été dilués (1:100) dans de l'eau distillée. De plus, des échantillons standards d'albumine (Sigma-Aldrich, États-Unis) de concentration connue ont été préparés. Les standards et les échantillons à doser ont ensuite été déposés sur une plaque multi-puits, après quoi du Bleu de Coomassie (BioRad, Belgique) a été ajouté. Celui-ci permet, selon la méthode de Bradford, de déterminer la quantité de protéines de chaque échantillon en réagissant avec les acides aminés de celles-ci, induisant alors un changement de couleur des échantillons. Finalement, après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 640 nm grâce à un spectrophotomètre (Versa max micro plate reader, Molecular devices, États-Unis). Les échantillons standards ont alors permis de réaliser une courbe standard et une équation en a été déduite, permettant ainsi le calcul de la concentration en protéines de chaque échantillon (µg/ml).

II.5. Analyses sur les tissus rénaux

a) RTq-PCR

À l'exception des étapes spécifiées comme étant effectuées à une température donnée, toutes les manipulations décrites à partir de l'extraction d'ARN jusqu'à la *Reverse transcriptase* ont été réalisées à 4°C.

Extraction d'ARN

Un quart de rein a été immergé dans 1 ml de TRIzol® Reagent (Sigma, États-Unis) et mécaniquement homogénéisé à l'aide d'un potter électrique (Heidolph, Allemagne). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 200 µl de chloroforme (VWR, France) ont été ajoutés à aux homogénats afin de séparer l'ARN, l'ADN et les protéines. Afin de mélanger les

échantillons et de promouvoir l'action du chloroforme, les éppendorfs ont été mélangés par inversion durant 15 secondes et une incubation de 3 minutes à température ambiante a été effectuée. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 20 minutes à 12 000 g afin de séparer les différentes phases citées ci-dessus. La solution aqueuse a ensuite été transférée dans un nouvel éppendorf stérile et 500 µl d'alcool d'isopropyle (Merck, Allemagne) y ont été ajoutés afin de précipiter l'ARN. Les tubes ont ensuite été mélangés par inversion durant 15 secondes pour mélanger la solution et une incubation de 10 minutes à température ambiante a été respectée afin de permettre l'action de l'isopropyle. Après une centrifugation de 15 minutes à 12 000 g, le surnageant a été élué et le culot, qui contient l'ARN, a été lavé avec 1 ml d'éthanol 75% (Univar, Belgique). Finalement, les échantillons ont été vortexés puis centrifugés une dernière fois à 7500 g pendant 5 minutes, après quoi le surnageant a été élué et les échantillons sont alors prêts pour le traitement à l'ADN^{ase}.

Traitement à l'ADN^{ase}

Après l'étape d'extraction d'ARN, les échantillons ont été incubés 30 minutes à 37°C avec un mix composé d'ADN^{ase}, de tampon ADN^{ase} et d'eau « RNA^{ase}-free » (Promega, États-Unis) afin de dégrader l'ADN contaminant qui pourrait encore être présent dans les échantillons. Au terme de l'incubation, la réaction a été arrêtée avec 1 µl d'« ADN^{ase} stop », nécessitant 30 minutes d'incubation à 37°C suivies de 10 minutes d'incubation à 65°C pour agir. Finalement, 9 µl d'eau « RNA^{ase}-free » ont été ajoutés aux échantillons afin d'obtenir un volume final de 20 µl et la concentration en ARN a été mesurée grâce à un spectrophotomètre Nanodrop 100 (ThermoFisher, États-Unis).

Reverse Transcriptase

Afin d'obtenir de l'ADNc (ADN complémentaire), une *Reverse Transcriptase* (RT)-PCR a été réalisée. Pour commencer, le volume adéquat contenant 5 µg d'ARN a été prélevé et dilué dans de l'eau « RNA^{ase}-free ». 1 µl de « random hexamer » a ensuite été ajouté aux échantillons. Cet hexamère se fixe de manière aléatoire aux ARN et permet la transcription de l'ARN en ADNc. Finalement, 8 µl de mix tampon de réaction contenant : l'inhibiteur d'ARN^{ase} RiboLock, les dNTP et l'enzyme RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher, États-Unis) ont été ajoutés. De plus, plusieurs échantillons ont été traités en duplicat afin de réaliser un contrôle négatif de la RT-PCR en remplaçant l'enzyme par de l'eau « RNA^{ase}-free » dans le mix. Après avoir été vortexés et centrifugés, les échantillons ont été placés dans le C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, Belgique) qui a appliqué une température de 42°C durant 1h et de 70°C durant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C.

PCR quantitative en temps réel

La RT-qPCR permet de quantifier l'expression relative d'un gène. Dans le cadre de ce mémoire, l'expression des gènes *HO-1*, *IL-6*, *IL-1β*, *MCP-1*, *NGAL*, *NRF-2*, *SIRT1/3*, *SOD-1/2* et *TNF-α* (Tableau 3) ont été quantifiés dans les reins de souris traitées aux AA. Le gène *18S*, codant pour de l'ARN ribosomal, a été utilisé comme « *housekeeping gene* » car son niveau d'expression est constant dans tous les tissus. Afin de réaliser la RT-qPCR, un mix composé de 10 µl de SyberGreen (Roche, Suisse) et de 5 µl des amorces sens et anti-sens a été chargé dans une plaque 96 puits ainsi que 5 µl d'ADNc. Les amorces sens et anti-sens se fixent aux extrémités du gène d'intérêt et permettent ainsi son amplification qui est visualisée grâce au SyberGreen, un agent intercalant. Finalement, la plaque a été centrifugée 1 minute à 12 000 g et a été insérée dans le LightCycler® 96 (Roche, Suisse) qui a appliqué 40 fois le cycle suivant : 15 secondes à 95°C – 10 secondes à 60°C – 20 secondes à 72°C. Les données ont été analysées selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tableau 3. Liste des gènes ciblés par la RT-qPCR sur homogénats de reins ainsi que les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées.

Gène d'intérêt	Direction	Séquence de l'amorce (5' → 3')
18S	S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT
	A	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT
HO-1	S	GAAGGGTCAGGTGTCCAGAG
	A	CCAGGTAGCGGGTATATGCGT
IL6	S	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA
	A	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
IL1β	S	AGTTGACGGACCCCAAAAG
	A	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
MCP-1	S	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA
	A	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
NGAL	S	ATGTCACCTCCATCCTGGTC
	A	CCTGTGCATATTTCCCAGAGT
NRF-2	S	AGGCATCTTGTTTGGGAATGTG
	A	CTTTAGCTAGCGACAGAAGGAC
SIRT1	S	CAGTGAGAAAATGCTGGCCTA
	A	TTGGTGGTACAAACAGGTATTGA
SIRT3	S	TCCTCTGAAACCGGATGG
	A	TCCCACACAGAGGGATATGG
SOD1	S	AAGGCCGTGTGCGTGCTGAA
	A	CAGGTCTCCAACATGCCTCT
SOD2	S	TGCTCTAATCAGGACCCATTG
	A	GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC
TNF-α	S	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC
	A	CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC

A : anti-sens - S : sens

b) Western blot

Quantification

Les analyses Western Blot ont été effectuées d’une part sur des homogénats de rein prélevés avant immunoprécipitation des mitochondries et mélangés à 50 µl de tampon de lyse DLA-mito (Urée 7 M, Merck, Allemagne – Thiourée 2 M, CHAPS 1%, et ASB14 1%, Sigma-Aldrich, États-Unis – Tris 30 mM, Invitrogen, États-Unis – SDS 1%, Panreac, Espagne) et d’autre part, sur les échantillons récupérés après immunoprécipitation des mitochondries (voir plus haut). La quantité de protéines totales a été déterminée dans chaque échantillon grâce au réactif Pierce™ 660nm (ThermoFisher Scientific, États-Unis) qui contient un complexe colorant-métal qui a la propriété de se lier aux acides aminés basiques des protéines. La déprotonation du colorant dans des conditions acides induit un changement de couleur de l’orange vers le vert,

ainsi qu'un changement d'absorption maximale du colorant. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, lorsque la réaction s'est stabilisée, l'absorbance a donc été lue à une longueur d'onde de 660 nm grâce à un spectrophotomètre xMark™ Microplate (BioRad, Belgique). Une droite standard a été réalisée avec les échantillons standards de concentration connue en BSA (ThermoFisher Scientific, États-Unis), permettant ainsi le calcul de la concentration en protéines de chaque échantillon.

Préparation des échantillons

Tout d'abord, les échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée afin d'obtenir un total de 10 µg de protéines pour le marquage des protéines SIRT3 et SIRT1. 5 µl de bleu de charge (dilution 1:5) ont ensuite été ajoutés aux échantillons afin de dénaturer les protéines, d'alourdir l'échantillon et de visualiser le front de migration. Pour ce faire, le bleu de charge est composé de « *spacer gel buffer* » (Tris-HCl 143 mM, Carl Roth, Belgique), de SDS 20% (Carl Roth, Belgique), de β-mercaptoéthanol (2 M, Gibco, États-Unis), de Glycérol (Merck, Allemagne) et de bleu de bromophénol (0.75 mM, Janssen, Belgique). Les échantillons ont ensuite été chauffés 5 minutes à 100°C afin de dénaturer les protéines et ont ensuite été centrifugés 2 minutes à 12 000 g pour concentrer l'entièreté de l'échantillon dans le fond du tube. 20 µl de chaque échantillon ont finalement été chargés sur le gel.

Migration

Le gel de migration comprend deux parties : le « *stacking* » gel et le « *running* » gel. Le « *stacking* » gel permet aux protéines d'être concentrées à l'entrée du « *running* » gel qui, quant à lui, permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les gels sont composés de Tris 1,5 M pH 8,8, de Temed (Rooth, France), d'Acrylamide 30%, d'APS 10% (BioRad, Belgique), de SDS 10% (Sigma-Aldrich, États-Unis) et d'eau distillée, et ce, en quantités différentes en fonction du type de gel et du pourcentage. Les gels ont été coulés entre deux plaques en verre et un peigne de 0,75 mm a été glissé dans le « *stacking* » gel afin d'y former les puits où les échantillons ont été déposés. Le gel a ensuite été disposé dans une cuve remplie de tampon de migration (Tris Base et Glycine, Rooth, France – SDS, Sigma-Aldrich, États-Unis – eau distillée) et branchée à un dispositif électrique. Pour commencer, 100 V ont été appliqués durant les 5 premières minutes, permettant aux protéines de rentrer dans le « *stacking* » gel. Durant la suite de la migration, 130 V ont été appliqués. En plus d'un échantillon de chaque groupe expérimental, 6 µl de marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (BioRad, Belgique) ont été chargés.

Transfert

Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane en PolyVinylidène Fluoride (PVDF). Pour ce faire, la membrane a été activée durant 15 secondes dans de l'éthanol puis lavée avec de l'eau distillée et du tampon de transfert (Tris Base et Glycine, Roth, France – Ethanol, Univars, Belgique – Eau distillée). La membrane activée et le gel ont ensuite été placés en sandwich entre 6 papiers buvards et deux éponges imbibés de tampon de transfert. Le tout a finalement été disposé dans une cuve remplie de tampon de transfert et placée dans un bac rempli de glace afin d'éviter que le dispositif surchauffe. Un courant d'ampérage constant (0,3 A) a finalement été appliqué durant 1h30 afin d'entraîner les protéines du gel vers la membrane.

Marquage et révélation

À la fin du transfert, la membrane a été placée pendant une heure dans une solution contenant 3 ml de PBS et 3 ml d'Odyssey Blocking Buffer PBS (LI-COR, États-Unis), permettant de saturer les sites antigéniques aspécifiques de la membrane et, de ce fait, de diminuer le bruit de fond. Après cela, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire

(Tableau 2) dilué dans de l’Odyssey Blocking Buffer PBS (LI-COR, États-Unis)-Tween20 0,1% (BioRad, Belgique). À la fin de l’incubation, la membrane a été lavée 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS-Tween20 0,1% (BioRad, Belgique) avant d’être incubée 1 heure à température ambiante avec l’anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Après cette dernière incubation, la membrane a été lavée 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS-Tween20 0,1% (BioRad, Belgique) et deux fois rapidement avec du PBS avant d’être séchée durant 30 minutes dans une étuve. Les protéines ont ensuite été visualisées avec l’Odyssey® imaging system (LI-COR, États-Unis) à une longueur d’onde de 800 nm pour les protéines d’intérêt et de 700 nm pour les contrôles de charge. Pour finir, la fluorescence de chaque bande a été quantifiée avec le programme Image Studio™ Lite Version 5.2 (LI-COR, États-Unis). Finalement, la fluorescence des bandes obtenues en Western blot a été normalisée avec la fluorescence de la GAPDH selon la formule suivante :

$$\text{Expression de la protéine (\%)} = \frac{\text{Fluorescence de la protéine d'intérêt}}{\text{Fluorescence du contrôle de charge}} \times 100$$

Tableau 4. Liste des marquages réalisés, du poids moléculaire de la protéine d’intérêt, des anticorps primaires et secondaires relatifs, de la dilution choisie, du temps d’incubation et du pourcentage des gels.

Protéine d’intérêt	Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Pourcentage des gels (%)
GAPDH (37 kDa)	Souris 1:1000, 30min à TA (Cell Signaling, États-Unis)	Chèvre anti-souris 700 nm 1:10 000 (LI-COR, États-Unis)	<i>Stacking</i> : 5 <i>Running</i> : 10
SIRT3 (28 kDa)	Lapin 1:500, O-N à 4°C, (Cell Signaling, États-Unis)	Chèvre anti-lapin 800 nm 1:10 000 (LI-COR, États-Unis)	<i>Stacking</i> : 5 <i>Running</i> : 10

O-N : Over-night – TA : Température ambiante

II.6. Analyses statistiques

Les données présentées sont des moyennes ± S.E.M. (erreur standard de la moyenne). Une analyse de variance (one way ANOVA) a été réalisée afin de comparer les groupes et a été suivie d’un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple entre les groupes (GraphPad Prism, Version 5.04). Une *Valeur-p* de 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) a été calculé avec les données de la diurèse et des concentrations en créatinine plasmatique et urinaire selon la formule suivante :

$$\text{DFG (ml/min)} = \frac{\text{Diurèse (ml/min)} \times \text{Créatinine urinaire}}{\text{Créatinine plasmatique}}$$

III. Expérimentations in vitro

III.1. Cellules

Les cellules HK-2 sont des cellules humaines épithéliales de tubules proximaux qui ont été immortalisées avec l’HPV-16 (« *human papillomavirus-16* »). Les cellules HK-2 ont été

obtenues à l'American Type Cell Collection (ATCC® CRL-2190™, Belgique) et ont été cultivées dans du milieu « *Keratinocyte serum-free medium* » (K-SFM) additionné de 50 mg/ml d'extrait d'hypophyse bovine et 5 ng/ml de facteur de croissance épithélial recombinant, comme recommandé par l'ATCC. Durant tout le protocole, les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ et ont été repiquées à chaque fois qu'une confluence de 80% était atteinte.

III.2. Traitement

Tout d'abord, une solution stock d'AA a été préparée en diluant 5,118 mg d'acide aristolochique I (Sigma-Aldrich, États-Unis) dans 1 ml de Diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich, États-Unis) afin d'obtenir une concentration de 15 mM. Pour permettre la solubilisation des AA, la solution a été chauffée à 60°C dans un bain-marie pendant 30 minutes et vortexée toutes les 10 minutes. Après retour de la solution à température ambiante, la solution a été filtrée à l'aide d'un filtre Filtropur de 0,2 µm (Sarstedt, Allemagne) afin d'obtenir une solution stérile qui est ensuite conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière durant toute la durée de l'expérimentation. Au moment de l'intoxication des cellules, une solution de 50 µM a été fraîchement préparée en diluant (1:300) la solution stock dans du milieu de culture K-SFM stérile.

IV. Analyses sur les échantillons récoltés lors du protocole *in vitro*

IV.1. Tests de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée avec du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium (test MTT, voir point IV.1.a) et avec un test de dosage de la Lactate déshydrogénase (test LDH, voir point IV.1.b) libéré dans le milieu de culture et ce pour des concentrations en AA de 10, 25, 50, 75 et 100 µM. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture à 12 puits (1,5 x 10⁵ cellules par puit) (Corning-Costar®, États-Unis), à raison d'une boîte par temps étudié et 36 heures avant le début de l'incubation en présence des AA. À 80% de confluence, le milieu de culture de chaque puits a été remplacé par du milieu K-SFM frais ou par du milieu K-SFM frais contenant les diverses concentrations d'AA afin d'identifier la concentration d'AA optimale pour la suite des expérimentations. Cette concentration optimale serait une concentration qui induit une intoxication progressive des cellules, visualisée par une augmentation de la mortalité cellulaire au cours du temps. A la fin de chaque temps d'incubation, un test MTT/LDH a été réalisé, voir ci-dessous.

a) Test MTT

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire, un test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) a été réalisé. Tout d'abord, les cellules ont étéensemencées dans une boîte de culture à 12 puits (Corning-Costar®, États-Unis). Après 24 heures, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais (contrôle négatif) ou du milieu frais contenant différentes concentrations d'AA. Les cellules ont ensuite été incubées dans ces conditions pendant les différents temps explicités au point II.3. Au terme de ces incubations, 500 µl du milieu de culture ont été élués et 500 µl de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich, États-Unis) dilué dans du PBS (2,5 mg/ml) ont été ajoutés. Après cela, les cellules ont subi une incubation de 2h à 37°C pour permettre à la succinate déshydrogénase des cellules métaboliquement actives de réduire le MTT en son dérivé formazan qui forme des cristaux de coloration mauve en milieu aqueux. Une fois l'incubation terminée, le surnageant a été remplacé par 500 µl de tampon de lyse (SDS 30%,

Panreac, Espagne – N,N-diméthyl-formamide 2:1 ; pH 4,7 (acide acétique 80 % + HCl 1 N 9:1)) et les échantillons ont été placés sous agitation pendant 1h à 37°C. Finalement l'absorbance a été lue au spectrophotomètre (xMark™ Microplate, BioRad, Belgique) à une longueur d'onde de 570 nm afin de déterminer la quantité de MTT réduit et, de ce fait, l'estimation de la viabilité cellulaire. Les résultats ont ensuite été obtenus selon la formule suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon test}}{\text{Absorbance des cellules contrôle}} \times 100$$

b) Test LDH

Afin d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité des AA, un test de dosage colorimétrique d'activité de la Lactate déshydrogénase (LDH) a été réalisé. La LDH est une enzyme présente dans les cellules et est libérée dans le milieu lors de la mort cellulaire impliquant une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique. Le but de ce test est donc de quantifier la LDH intracellulaire ainsi que les quantités présentes dans le milieu de culture, les corps apoptotiques, les cellules détachées et les débris cellulaires. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées et intoxiquées comme décrit au point II.3 et la mesure de l'activité de la LDH a été réalisée à l'aide du « Cytotoxicity Detection kit » de Roche (Suisse). Le principe de ce kit est d'évaluer la quantité de LDH dans le milieu en se basant sur l'activité enzymatique de la LDH, laquelle transforme le lactate en pyruvate. Brièvement, en présence de lactate et du NAD^+ , la LDH oxyde le lactate en pyruvate et réduit le NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$. L'accumulation de NADH dans le milieu permet par la suite la conversion de l'iodotétrazolium chloride (INT) en sel de formazan grâce à une enzyme oxydant le NADH (Figure 14), sel de formazan qui présente une coloration bleue.

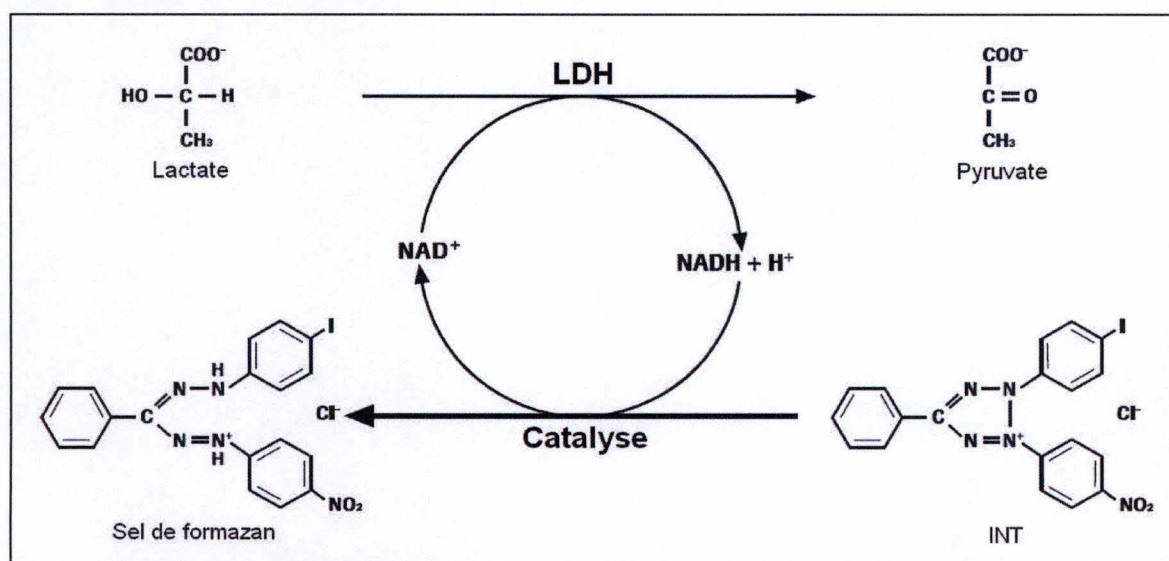


Figure 14. Principe du test LDH (Cytotoxicity Detection kit, Roche, Suisse).

Toutes les étapes décrites ci-dessous ont été réalisées à une température de 4°C. Au terme des différentes incubations, le milieu de culture a été centrifugé durant 5 minutes à 250 g. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et le culot, contenant les cellules détachées, corps apoptotiques et les débris cellulaires, a été homogénéisé dans 250 μl de PBS-Triton X100 à 2% (Sigma-Aldrich, États-Unis). Les cellules adhérentes ont également été incubées avec 250 μl de PBS-Triton 2% durant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été déposés dans une plaque 96 puits (Greiner Bio-One, Allemagne) de la manière suivante :

- 100 µl de culot
- 100 µl de surnageant
- 5 µl de lysat cellulaire et 95 µl de PBS-Triton X100
- 100 µl de milieu K-SFM (blanc du surnageant)
- 100 µl de milieu K-SFM-AA (blanc du surnageant des échantillons traités)
- 100 µl de PBS-Triton X100 (blanc du culot et du lysat)

Après l’addition de 100 µl du réactif fourni par le kit, la plaque a été conservée à l’abri de la lumière et conservée à température ambiante. L’absorbance a finalement été lue à 490 et 655 nm toutes les 15 minutes (xMark™ Microplate, BioRad, Belgique) jusqu’à ce que l’un des échantillons atteigne une valeur d’absorbance située entre 2 et 3. L’absorbance de 2 représente le seuil minimal en dessous duquel les valeurs d’absorbance ne sont pas fiables tandis que l’absorbance de 3 est l’absorbance au-delà de laquelle un plateau est observé. Finalement, les résultats ont été obtenus selon la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{culot} - \text{blc}) + ((\text{sur.} - \text{blc}) * 4)}{(\text{culot} - \text{blc}) + ((\text{sur.} - \text{blc}) * 4) + ((\text{lysate} - \text{blc}) * 20)} \times 100$$

IV.2. PCR quantitative en temps réel

Afin de générer les échantillons, deux boîtes de culture T25 (25 cm²) (Corning-Costar®, États-Unis) par timing ont étéensemencées avec des cellules HK-2 et ce, trois jours avant le début de l’intoxication par les AA. Lorsque les cellules ont atteints 80% de confluence (1,0 x10⁶ cellules), le milieu de culture des cellules contrôles a été remplacé par du milieu K-SFM frais tandis que celui des cellules des groupes expérimentaux a été remplacé par 10 ou 50 µM d’AA dilués dans du milieu K-SFM frais. Des incubations de 3, 6, 12 ou 24 heures ont été réalisées pour la concentration de 50 µM tandis que des incubations de 24, 48, 72 ou 96 heures ont été réalisées pour la concentration de 10 µM. Au terme de l’incubation, les échantillons ont été récoltés selon la méthode décrite ci-dessous.

Toutes les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées en conditions « *RNA^{se}-free* ». Pour commencer, le milieu de culture a été élué et 350 µl de tampon RLT (RNeasy Mini kit 50, Qiagen, Allemagne), permettant l’extraction d’ARN, ont été ajoutés dans chaque T25. Les cellules ont ensuite été détachées de leur support avec un racloir et le lysat cellulaire a été récolté dans des microtubes de 2 ml (Qiagen, Allemagne). Les étapes d’extraction d’ARN et de traitement à l’ADN^{ase} ont ensuite été réalisées par le QIAcube (Qiagen, Allemagne). Toutes les étapes suivant le traitement à l’ADN^{ase} sont identiques à celles décrites pour la RT-qPCR sur homogénats de reins. Dans le cadre de ce mémoire, l’expression des gènes *SIRT1/3* (Tableau 5) ont été quantifiés dans les cellules traitées aux AA. Le gène *18S*, codant pour de l’ARN ribosomal, a été utilisé comme « *housekeeping gene* ». Les données ont été analysées selon la méthode du 2^{-ΔΔCt}.

Tableau 5. Liste des gènes ciblés par la RT-qPCR sur cellules HK-2 ainsi que les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées.

Gène d’intérêt	Direction	Séquence de l’amorce (5’ → 3’)
<i>18S</i>	S	TGGTGCATGGCCGTTCT
	A	TAGTTAGCATGCCAGAGTCTCGTT
<i>HO-1</i>	S	GCAGTCAGGCAGAGGGTGATA
	A	CAACTCCTCAAAGAGCTGGATGTT

<i>KIM-1</i>	S	CTGCAGGGAGCAATAAGGAG
	A	ACCCAAAAGAGCAAGAAGCA
<i>NRF-2</i>	S	GCAAGTTTGGGAGGAGCTATTATC
	A	AGTTTGGCTTCTGGACTTGGAA
<i>SIRT1</i>	S	TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA
	A	ACAGCTTCACAGTCAACTTT
<i>SIRT3</i>	S	TCACTACTTTCTCCGGCTGC
	A	CAATGTCGGGCTTCACAACG
<i>SOD1</i>	S	ATGGTGTGGCCGATGTGTC
	A	CACCTTTGCCCAAGTCATCTG
<i>SOD2</i>	S	CAAATTGCTGCTTGTCCAAATC
	A	CGTGCTCCCACACATCAATC

A : anti-sens - S : sens

IV.3. Western blot

Afin de générer les échantillons, deux boîtes de culture T25 (25 cm²) (Corning-Costar®, États-Unis) par timing ont étéensemencées avec des cellules HK-2 et ce, trois jours avant le début de l'intoxication par les AA. Lorsque les cellules ont atteints 80% de confluence (1,0 x10⁶ cellules), le milieu de culture des cellules contrôles a été remplacé par du milieu K-SFM frais tandis que celui des cellules des groupes expérimentaux a été remplacé par 10 ou 50 µM d'AA dilués dans du milieu K-SFM frais. Des incubations de 3, 6, 12 ou 24 heures ont été réalisées pour la concentration de 50 µM tandis que des incubations de 24, 48, 72 ou 96 heures ont été réalisées pour la concentration de 10 µM. Au terme de l'incubation, les échantillons ont été récoltés selon la méthode décrite ci-dessous.

Toutes les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées à une température de 4°C. Les cellules ont été incubées à une concentration de 50 µM durant 3, 6, 12 ou 24 heures ou à une concentration de 10 µM durant 24, 48, 72 ou 96 heures. Au terme de l'incubation, les milieux de culture des cellules ont été élués et les cellules adhérentes ont été lysées avec 1 ml de tampon de lyse composé à 50% de tampon de lyse « HIF » 2x, pH 7,4 (80 mM Tris, Carl Roth, Belgique – 300 mM KCl et 2 mM EDTA, Merck, Allemagne), 41% d'eau distillée, 1% de Triton X100 (Merck, Alleamgne) et 4% de PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Suisse) et de PIB (120 mM NaF, Merck, Allemagne – 250 mM β-glycérophosphate, VWR, Belgique – 25 mM Na₃VO₄ et 250 mM PNPP, Sigma-Aldriche, États-Unis) et détachées de leur support avec un racloir, puis récoltées dans un microtube. Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés durant 15 minutes à 9000 g. Après centrifugation, le surnageant du lysat cellulaire a été conservé. Finalement, les protéines des échantillons ont été dosés comme décrit pour les Western blot réalisés dans le cadre des expérimentations *in vivo* (voir point II.5.b) et les échantillons ont été aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à analyse. La suite du protocole, ainsi que la méthode de quantification, est identique au protocole de Western blot décrit au point III.5.b. Les marquages réalisés sont détaillés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Liste des marquages réalisés, du poids moléculaire de la protéine d'intérêt, des anticorps primaires et secondaires relatifs, de la dilution choisie, du temps d'incubation et du pourcentage des gels.

Protéine d'intérêt	Anticorps primaire	Anticorps secondaire	Pourcentage des gels (%)
GAPDH (37 kDa)	Souris 1:1000, 30min à TA (Cell Signaling, États-Unis)	Chèvre anti-souris 700 nm 1:10 000 (LI-COR, États-Unis)	<i>Stacking</i> : 5 <i>Running</i> : 10 ou 12
SIRT1 (120 kDa)	Lapin 1:500, O-N à 4°C, (Cell Signaling, États-Unis)	Chèvre anti-lapin 800 nm 1:10 000 (LI-COR, États-Unis)	<i>Stacking</i> : 5 <i>Running</i> : 12
SIRT3 (28 kDa)	Lapin 1:500, O-N à 4°C, (Cell Signaling, États-Unis)	Chèvre anti-lapin 800 nm 1:10 000 (LI-COR, États-Unis)	<i>Stacking</i> : 5 <i>Running</i> : 10

O-N : Over-night – TA : Température ambiante

IV.4. Microscopie confocale

a) MitoTracker®

Afin d'évaluer la morphologie de la population mitochondriale, un marquage de l'organite a été réalisé à l'aide de la sonde fluorescente MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probe Green (Invitrogen, États-Unis). Cette sonde a la capacité de s'intégrer dans la membrane des mitochondries, permettant ainsi leur visualisation en microscopie confocale. Pour commencer, les cellules sont comptées à l'aide d'un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, États-Unis) avant d'êtreensemencées à raison de 25 000 cellules par compartiment dans des chambres Lab-Tek® (Nalge Nunc International, États-Unis). Après 36 heures, les cellules ont été incubées pendant 24 heures dans du milieu de culture contenant 50 µM d'AA. Au terme de l'intoxication, le milieu a été remplacé par du milieu frais contenant 100 nM de sonde MitoTracker® (dilution 1:10 000) pendant 30 minutes à 37°C et dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Finalement, le milieu a été remplacé par du milieu frais et des micrographies sur cellules vivantes ont été prises au microscope confocal Broadbend Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Allemagne).

Dans le but d'analyser les résultats obtenus avec la sonde MitoTracker® en microscopie confocale, 30 cellules par condition ont été photographiées. Les analyses ont ensuite été réalisées en double-aveugle à l'aide du programme informatique Image J (Macbiophotonics, États-Unis) selon deux paramètres : l'« *Aspect ratio* » et le ratio entre les extrémités libres et branchées (Figure 15). Le premier permet de quantifier l'élongation du réseau mitochondrial tandis que le second correspond au ratio entre la somme des extrémités libres et la somme des points de connexion. Le ratio entre les extrémités libres et branchées permet donc d'analyser la fragmentation du réseau mitochondrial.

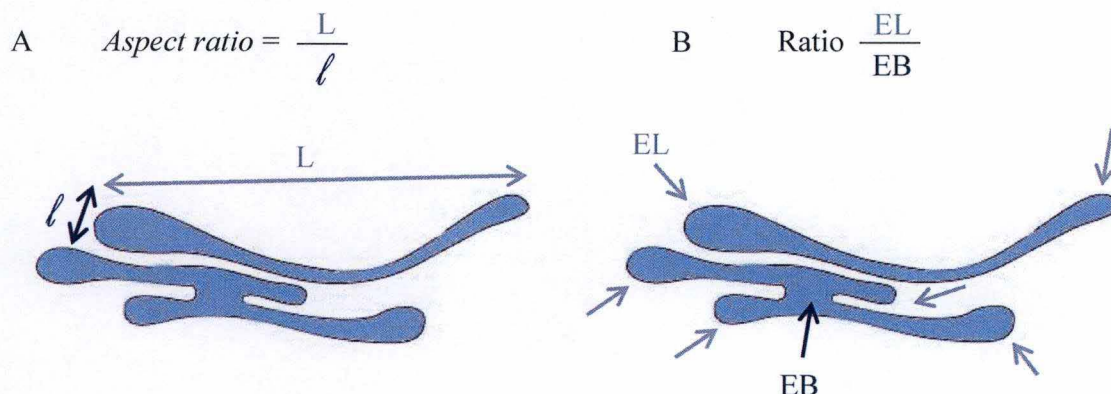


Figure 15. Réseau mitochondrial quantifié en fonction de (A) l'« Aspect ratio » et (B) le ratio entre les extrémités libres (EL) et branchées (EB). *L* : longueur du réseau mitochondrial – *l* : largeur du réseau mitochondrial.

b) Immunofluorescence

La première étape de l'immunofluorescence a été de placer des couvre-objets stériles dans une boîte de culture 24 puits (Corning-Costar®, États-Unis) et d'y ensemercer les cellules HK-2, à raison de 30 000 cellules par puits, comptées avec un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, USA). Après 36 heures, les cellules incubées pendant 3, 6, 12 et 24 heures dans du milieu de culture contenant une concentration de 50 μ M d'AA. Au terme des incubations, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec un mélange de Méthanol (80%)-Acétone (20%) (Merck, Allemagne) durant 10 minutes à température ambiante puis pendant 5 minute à 4°C. Les étapes suivantes ont ensuite été réalisées :

- 3x 5 minutes – Rinçage au PBS-BSA 1% (ThermoFischer, États-Unis)
- 30 μ l d'anticorps primaire PCNA (1:50, Abcam, États-Unis) *over-night* à 4°C
- 3x 5 minutes – Rinçage au PBS-BSA 1%
- 30 μ l d'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 Rabbit + Hoechst (1:1000, Molecular Probes, États-Unis)
- 3x 10 minutes – Rinçage au PBS-BSA 1%
- 10 minutes – Rinçage au PBS

Les cellules sont finalement montées sur lame grâce à une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich, États-Unis) chauffé à 56°C. Les lames sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à leur analyse avec le microscope confocal Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus, Japon). Afin d'analyser les résultats obtenus, chaque lame a été observée au microscope optique au grossissement 400x et 10 champs ont été observés pour chaque lame. Les analyses ont été réalisées en double-aveugle à l'aide du programme informatique Image J (Macbiophotonics, États-Unis). L'évaluation du marquage PCNA a ensuite été réalisée de la façon suivante :

$$x = \frac{\text{Nombre de noyaux positifs au PCNA}}{\text{Nombre total de noyaux}} \times 100$$

IV.5. Analyses statistiques

Les données présentées sont des moyennes \pm S.E.M. (erreur standard de la moyenne). Une analyse de variance (one way ANOVA) a été réalisée afin de comparer les groupes et a été suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple entre les groupes (GraphPad Prism, Version 5.04). Une *Valeur-p* de 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

I. Expérimentation *in vivo*

I.1. Données métaboliques

Les données métaboliques reprises dans le Tableau 7 ont été obtenues en pesant les reins et en mesurant les quantités d'eau et de nourriture absorbées pour le groupe contrôle (CTL) et les groupes expérimentaux 12 heures (H12), 24 heures (H24), 48 heures (H48), 72 heures (H72), 96 heures (H96) et 10 jours (J10) après intoxication aux AA. Pour ce qui est du poids des reins, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. En ce qui concerne la consommation de nourriture, une diminution significative est observée depuis H72 jusqu'à la fin du protocole en comparaison avec le groupe contrôle ($p \leq 0,05$ H72, H96 et J10 vs le groupe CTL). Finalement, une augmentation de l'eau absorbée est observée dans les groupes H72 et J10 par rapport au groupe contrôle ($p \leq 0,05$ H72 et J10 vs le groupe CTL).

Tableau 7. Évolution du poids des reins et de la prise de nourriture et d'eau pour les différents groupes expérimentaux.

	CTL	H12	H24	H48	H72	H96	J10
Poids des reins (mg)	329 ± 11	323 ± 13	315 ± 9	321 ± 6	298 ± 7	293 ± 10	350 ± 9
Absorption de nourriture (g/24h)	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4	3,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1 *	2,7 ± 0,1 *	2,8 ± 0,4 *
Absorption d'eau (ml/24h)	4,8 ± 0,3	5,7 ± 0,3	5,0 ± 0,7	5,6 ± 0,5	6,7 ± 0,3 +	6,0 ± 0,4	6,6 ± 0,6 +

Les données sont exprimées en moyennes ± S.E.M. ; n=8 pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées avec une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple.
* $p \leq 0,05$ vs les groupes CTL, H12 et H48 ; + $p \leq 0,05$ vs le groupe CTL.

I.2. Évaluation de la fonction rénale

Afin de caractériser la fonction rénale dans les différents groupes expérimentaux, divers paramètres urinaires et plasmatiques ont été étudiés.

Dans un premier temps, la diurèse et l'osmolarité urinaire ont été mesurées. La diurèse (Figure 16A) est significativement augmentée à partir de H72 et ce, jusqu'au dernier timing ($p \leq 0,01$ H96 et J10 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ H72 vs le groupe CTL). L'osmolarité urinaire (Figure 16B) évolue de manière inverse à la diurèse avec une diminution significative observée à partir du timing H72 et ce, jusqu'à la fin du protocole ($p \leq 0,001$ H72, H96 et J10 vs le groupe CTL).

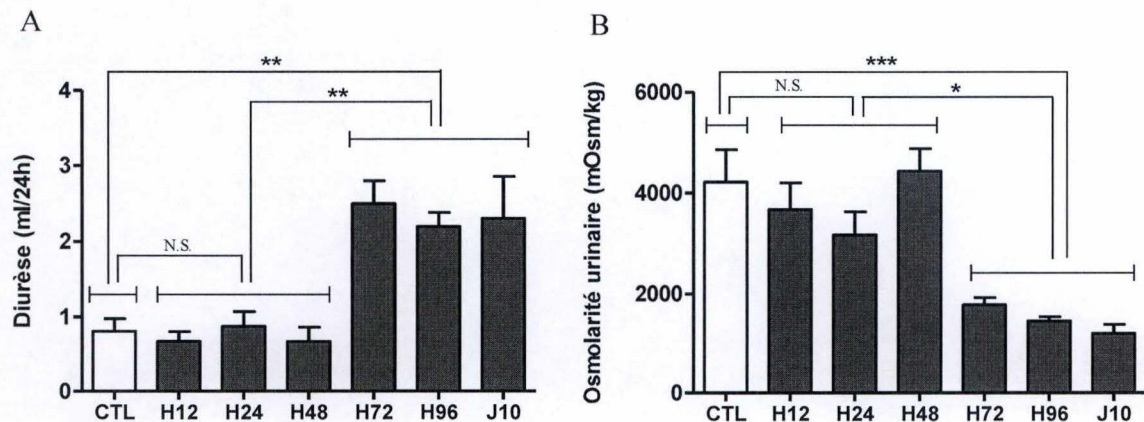


Figure 16. Évaluation de la fonction rénale pour chaque groupe expérimental caractérisée par (A) la diurèse (ml/24h) et (B) l'osmolarité urinaire (mOsm/kg). Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

Par ailleurs, les concentrations plasmatiques en urée et en créatinine, ainsi que le débit de filtration glomérulaire, ont été évaluées. Les Figures 17A et 17B représentent respectivement les résultats obtenus pour l'urémie et la créatininémie. Ces paramètres présentent un profil similaire caractérisé par une augmentation progressive au cours du protocole. De plus, pour l'urée plasmatique, une augmentation significative est observée à J10 ($p \leq 0,001$ J10 vs le groupe CTL) tandis que, pour la créatinine plasmatique, cette augmentation significative est observée dès le timing H72 ($p \leq 0,05$ H72 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ H96 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ J10 vs le groupe CTL). Finalement, le débit de filtration glomérulaire (Figure 17C) diminue significativement à partir de H72 jusqu'à J10 ($p \leq 0,01$ H72 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ H96 et J10 vs le groupe CTL).

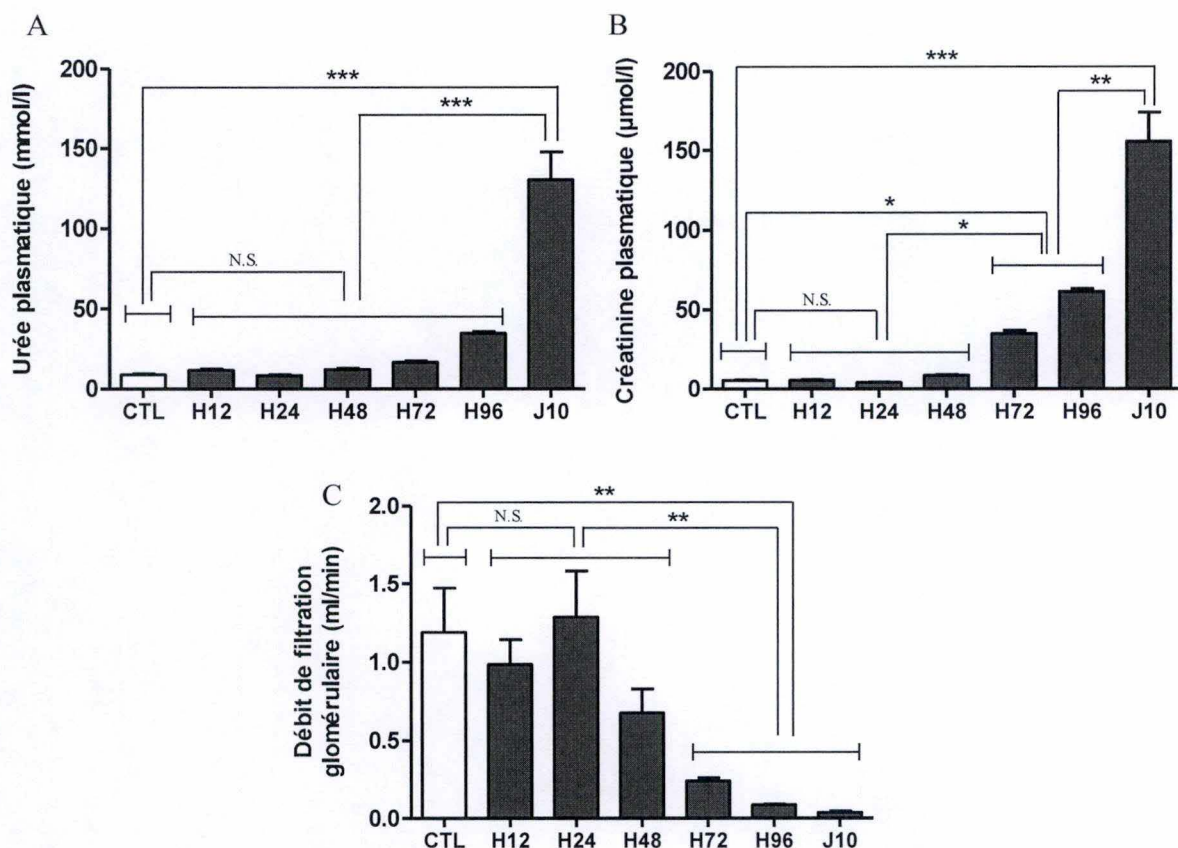


Figure 17. Évaluation de la fonction rénale pour chaque groupe expérimental en fonction des paramètres suivants : (A) concentration plasmatique de l'urée (mmol/l), (B) concentration plasmatique de la créatinine (μmol/l) et (C) débit de filtration glomérulaire (ml/min). Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

La protéinurie (Figure 18) a également été mesurée afin de mettre en évidence les altérations rénales. Ce dernier paramètre augmente significativement depuis le timing H72 jusqu'au timing J10, comparé au groupe contrôle ($p \leq 0,001$ H72, H96 et J10 vs le groupe CTL).

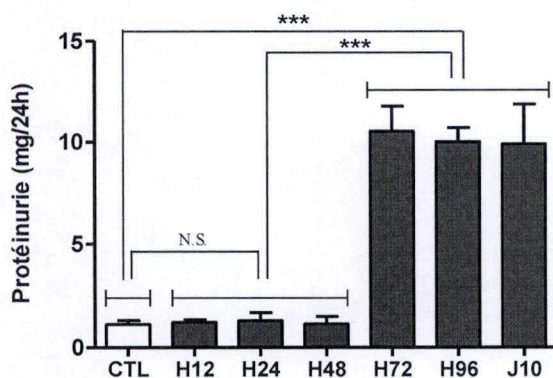


Figure 18. Évaluation de la protéinurie (mg/24h) pour chaque groupe expérimental. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

I.3. Caractérisation de la structure rénale et de la prolifération cellulaire

a) Analyse morphologique

Dans le but d'évaluer la structure rénale, des observations macroscopiques des reins provenant des souris de chaque groupe expérimental ont été réalisées (Figure 19). Une décoloration du cortex rénal est observable lorsque le temps d'intoxication augmente.

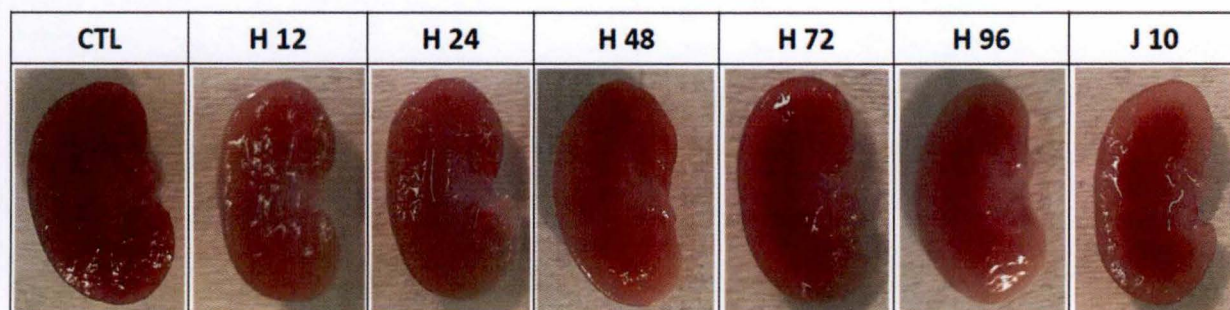


Figure 19. Aspect macroscopique des reins pour chaque groupe expérimental.






b) Analyses histologiques

L'analyse des coupes histologiques des reins de souris traitées a permis d'établir la séquence des dommages histologiques :

- À H12 (Figure 20A), une décoloration de certains noyaux des cellules tubulaires proximales est visible. De plus, les premières altérations des bordures en brosses de ces mêmes cellules sont observables, seulement à quelques endroits ;
- À H24 (Figure 20A), une augmentation de la fréquence des altérations de la bordure en brosse est observable. Les dommages restent cependant localisés dans certaines zones du tissu rénal ;
- À H48 (Figure 20B), une dégradation de la bordure en brosse est observée dans toute la coupe de rein. Quelques tubules nécrotiques, lesquels se distinguent par la présence de débris tissulaires dans la lumière du tubule, sont également observables ;
- À H72 (Figure 20B), la proportion des tubules nécrotiques augmente et de la protéinurie est également détectable dans les coupes histologiques de ce timing ;
- À H96 (Figure 20C), les tubules nécrotiques progressent en tubules atrophiques et la protéinurie augmente. Les tubules atrophiques se distinguent par l'absence complète de cellules épithéliales tubulaires proximales, ainsi que par l'absence de débris cellulaires dans la lumière du tubule ;
- À J10 (Figure 20C), la majorité des tubules sont atrophiques et de la protéinurie est présente en quantité dans le tissu.

Un tableau reprenant les diverses lésions observables aux différents timings est disponible en vis-à-vis des coupes histologiques (Tableau 8). De plus, un agrandissement des altérations décrites est disponible en Annexes.

Tableau 8. Dommages histologiques dans les sections de reins des divers groupes.

Altérations histologiques	Symbole	CTL	H12	H24	H48	H72	H96	J10
Noyaux décolorés		-	+	++	++	++	++	++
Altération de la bordure en brosse		-	+	++	++	+	-	-
Tubules nécrotiques		-	-	-	+	++	+++	+
Protéinurie		-	-	-	-	+	++	+++
Tubules atrophiques		-	-	-	-	-	-	+++

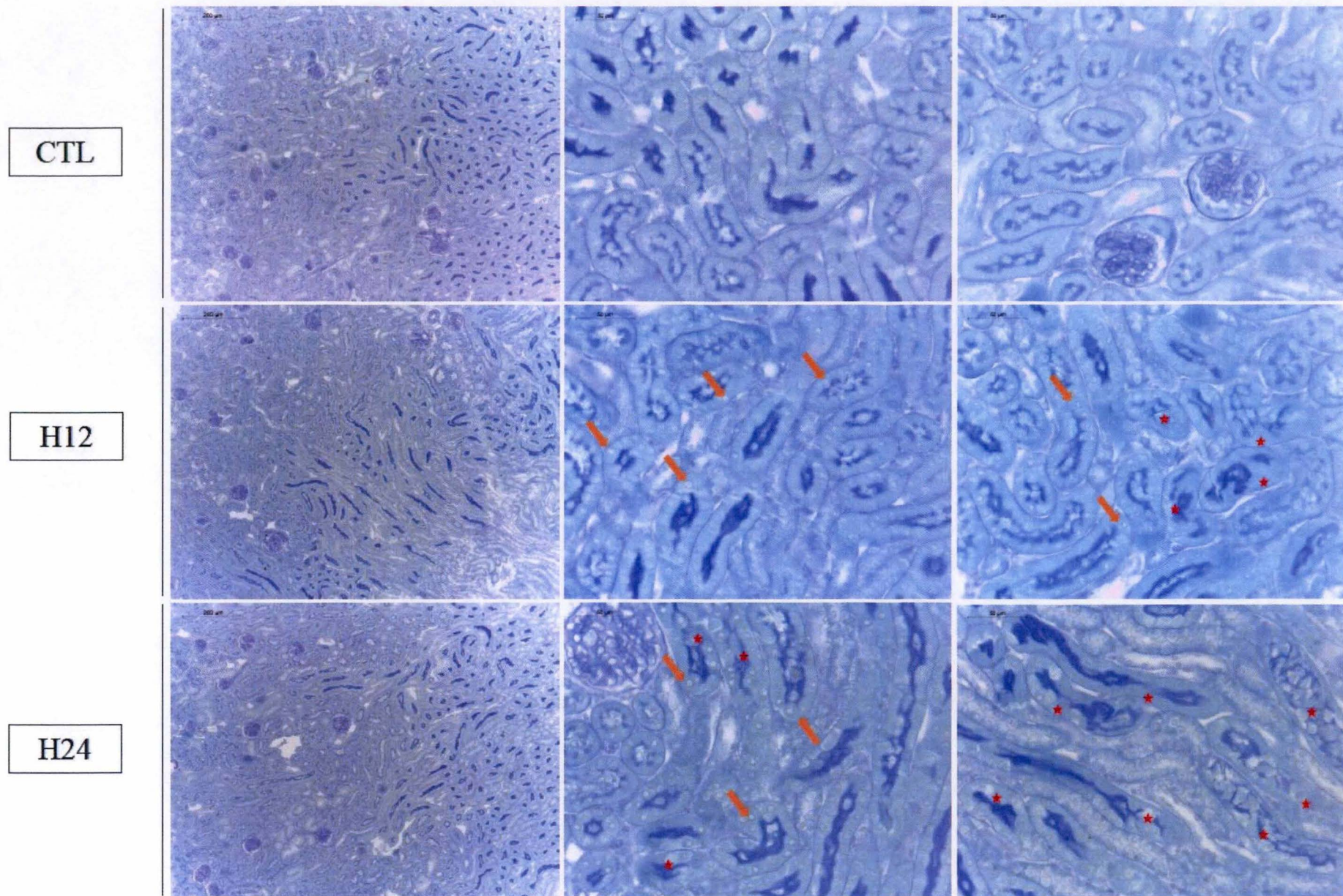
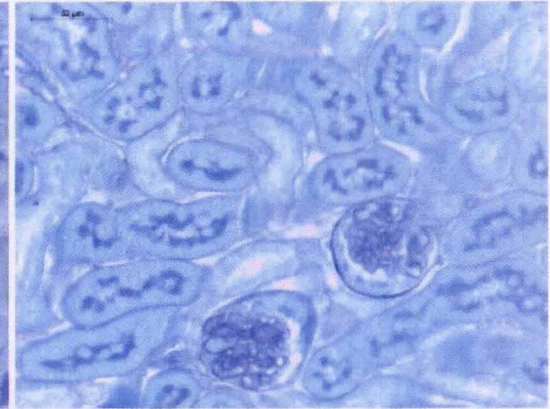
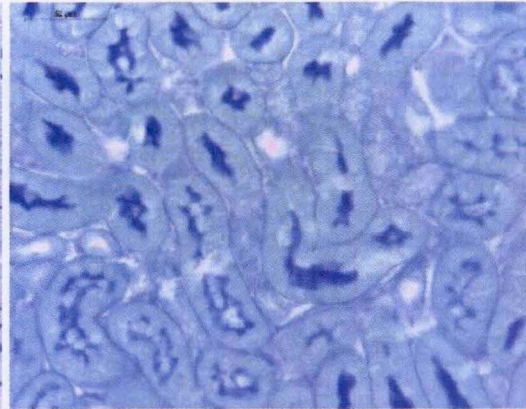
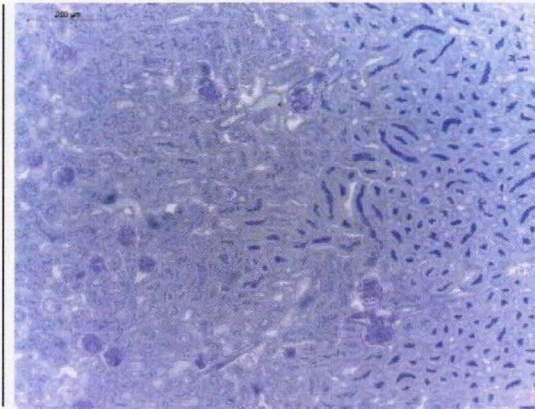


Figure 20A. Coloration PAS de coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H12 et H24. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x. ➡ Noyaux décolorés ★ Altérations de la bordure en brosse

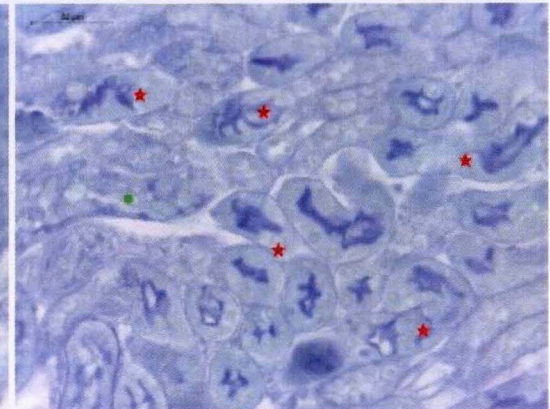
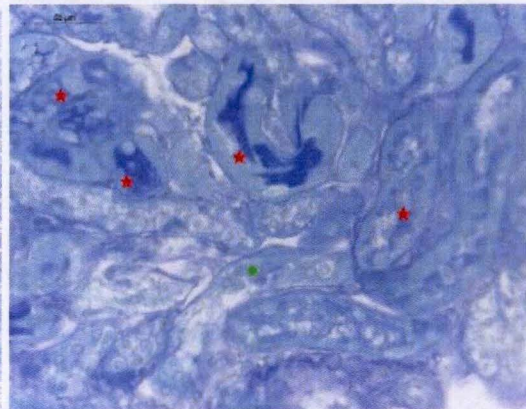
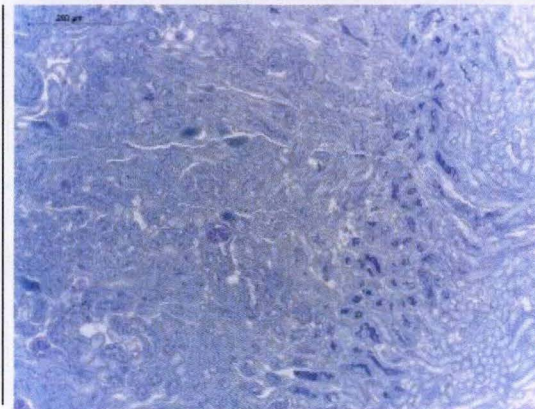
Tableau 8. Dommages histologiques dans les sections de reins des divers groupes.

Altérations histologiques	Symbole	CTL	H12	H24	H48	H72	H96	J10
Noyaux décolorés	↘	-	+	++	++	++	++	++
Altération de la bordure en brosse	★	-	+	++	++	+	-	-
Tubules nécrotiques	●	-	-	-	+	++	+++	+
Protéinurie	⬇	-	-	-	-	+	++	+++
Tubules atrophiques	▲	-	-	-	-	-	-	+++

CTL



H48



H72

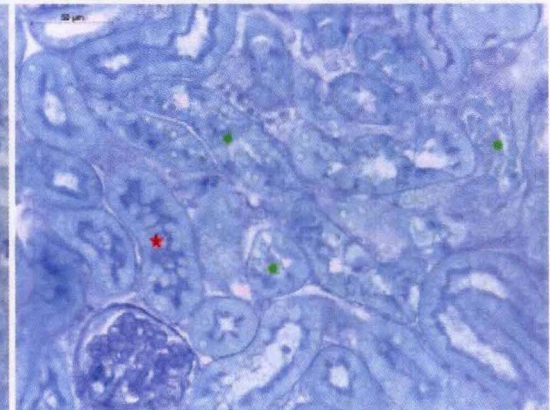
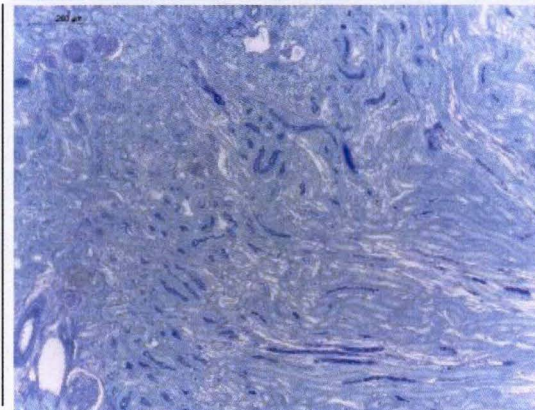





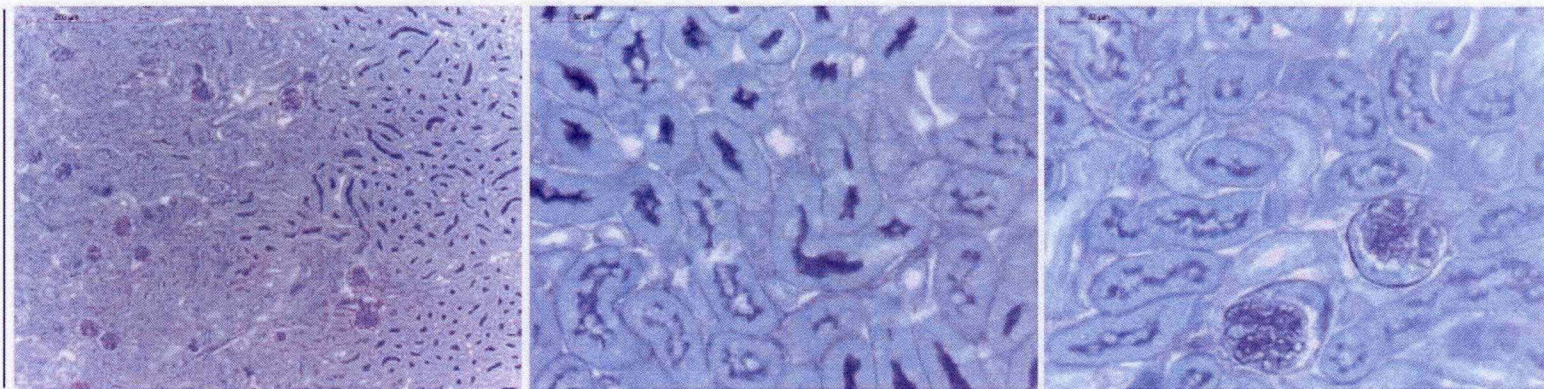


Figure 20B. Coloration PAS de coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H12 et H24. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x. ★ *Altérations de la bordure en brosse* ● *Tubules nécrotiques* ⬇ *Protéinurie*

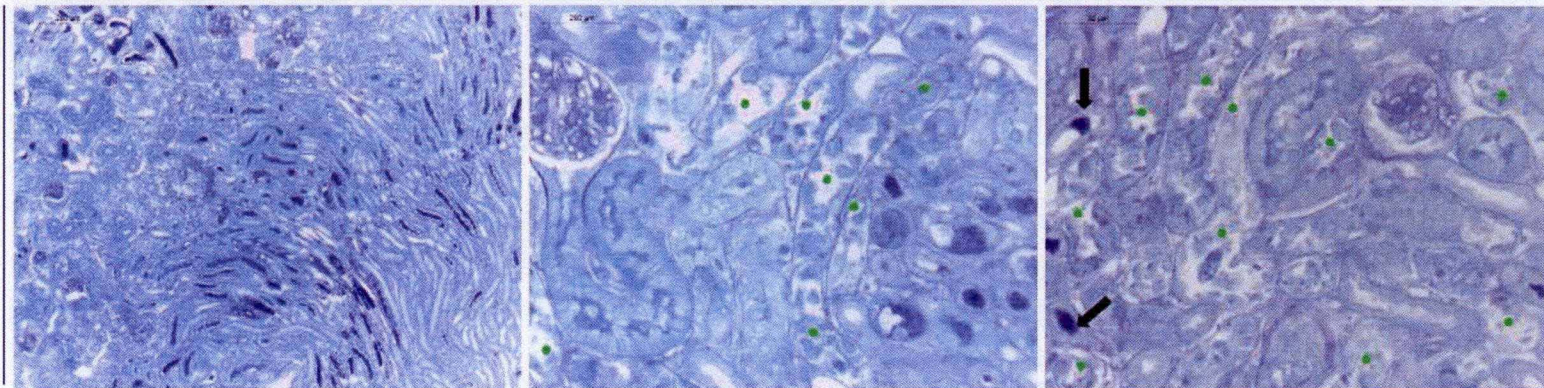
Tableau 8. Dommages histologiques dans les sections de reins des divers groupes.

Altérations histologiques	Symbole	CTL	H12	H24	H48	H72	H96	J10
Noyaux décolorés		-	+	++	++	++	++	++
Altération de la bordure en brosse		-	+	++	++	+	-	-
Tubules nécrotiques		-	-	-	+	++	+++	+
Protéinurie		-	-	-	-	+	++	+++
Tubules atrophiques		-	-	-	-	-	-	+++

CTL



H96



D10

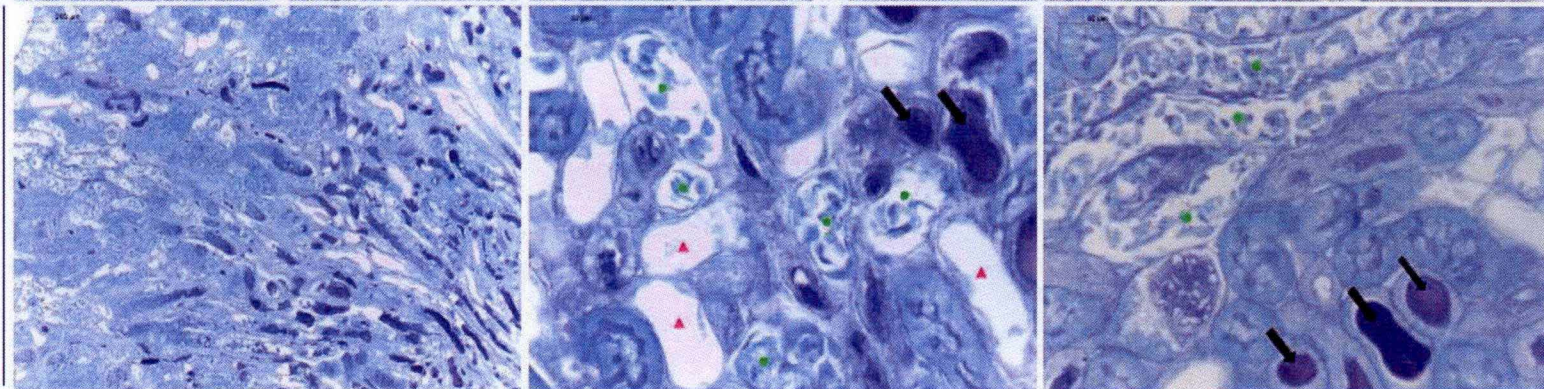


Figure 20C. Coloration PAS de coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H12 et H24. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x. ● Altérations de la bordure en brosse ▼ Protéinurie ▲ Tubules atrophiques

a) Marqueurs des altérations tubulaires

Afin d'évaluer la structure rénale, l'expression relative de l'ARNm de *NGAL* (« *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* ») (Figure 21) a également été quantifiée. Cette protéine est surexprimée dans le rein lors des dommages tubulaires et constitue donc l'un des biomarqueurs du stress rénal aigu. Une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *NGAL* est observable pour les groupes H72 (*fold increase* : 179,2) et J10 (*fold increase* : 213,4) comparé au groupe CTL ($p \leq 0,001$ H72 et J10 vs le groupe CTL). À H96 (*fold increase* : 43,9), une augmentation de l'expression relative de l'ARNm de *NGAL* est observée, laquelle n'atteint cependant pas une signification statistique effective.

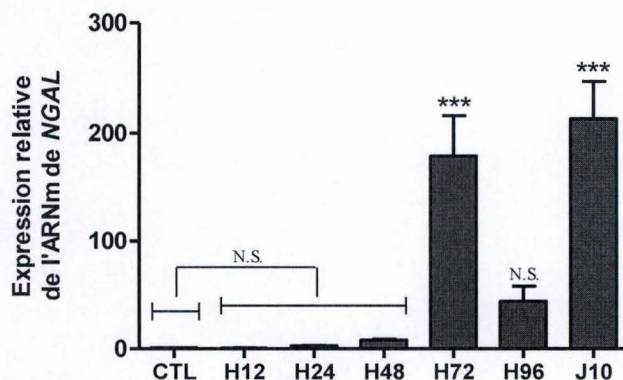


Figure 21. Expression relative de l'ARNm du gène *NGAL*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. *** $p \leq 0,001$ H72 et J10 vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

b) Évaluation du processus de prolifération cellulaire

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, un marquage de PCNA (« *Proliferating Cell Nuclear Antigen* ») a été réalisé par immunohistochimie (Figure 23). La protéine PCNA est un facteur de la polymérase δ qui permet la réplication de l'ADN. Son marquage a donc pour but de visualiser les noyaux en division cellulaire. Une augmentation significative du pourcentage de noyaux marqués pour la protéine PCNA est observée aux timings H96 et J10 en comparaison avec le groupe CTL (Figure 22) ($p \leq 0,001$ H96 et J10 vs le groupe CTL).

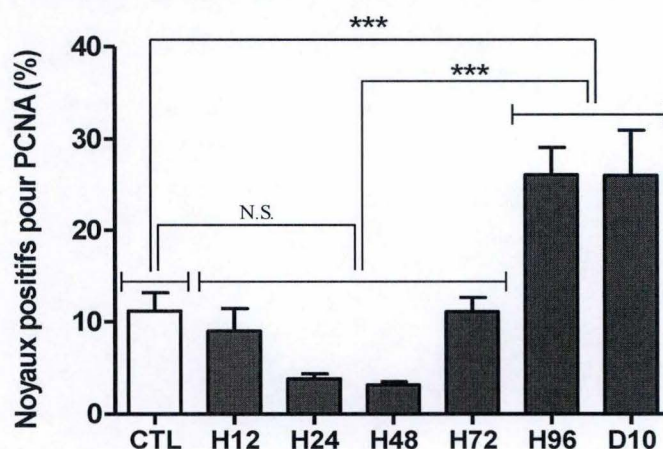
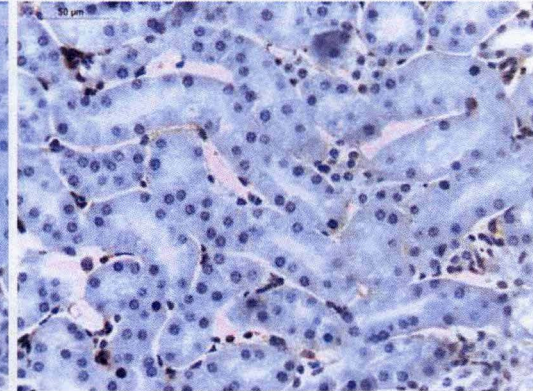
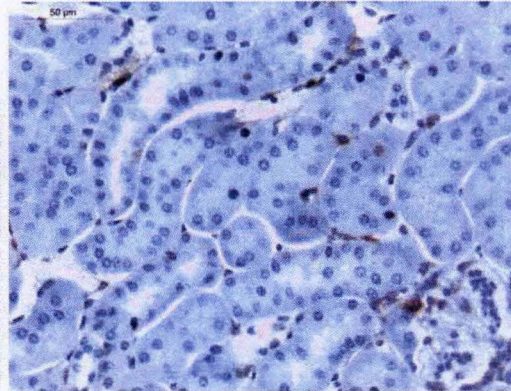
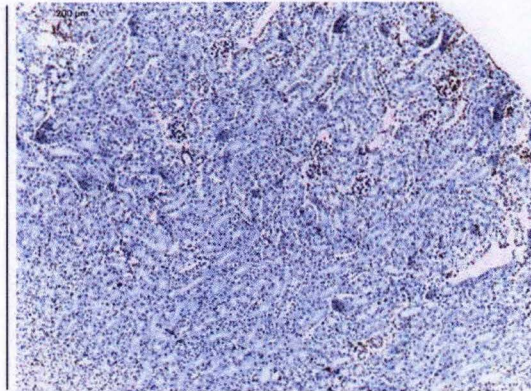
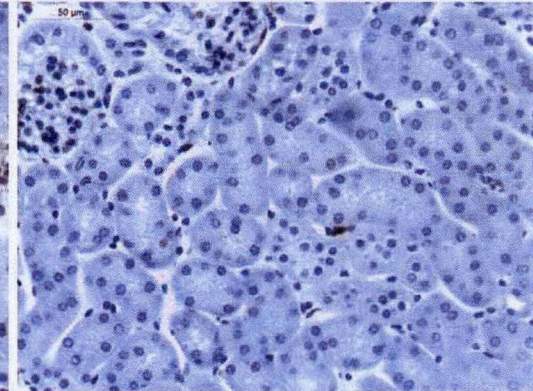
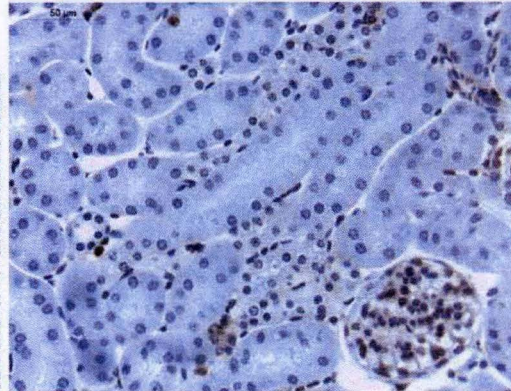
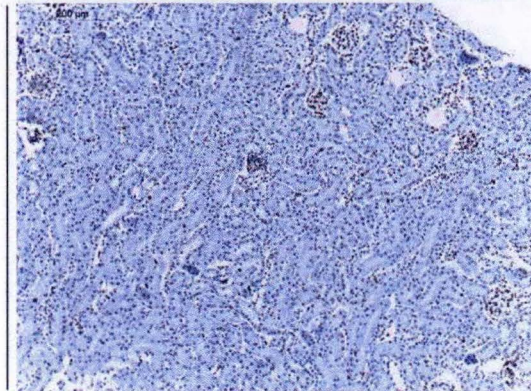


Figure 22. Pourcentage de noyaux positifs au marquage PCNA en immunohistochimie. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variances de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

CTL



H12



H24

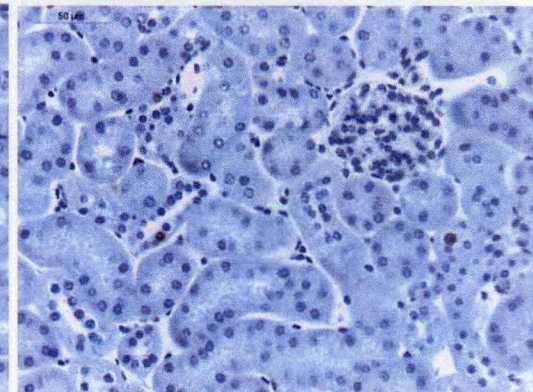
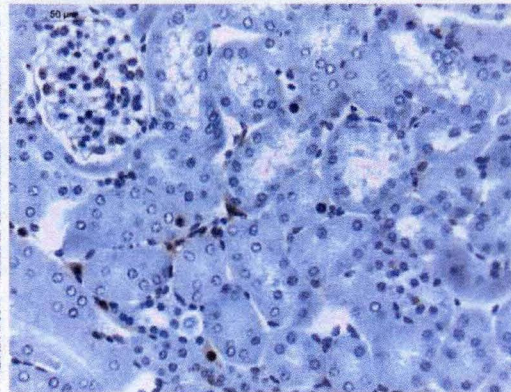
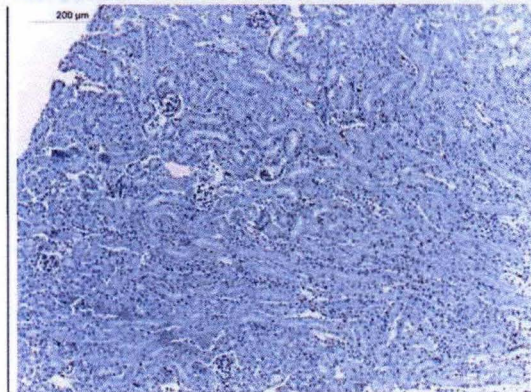
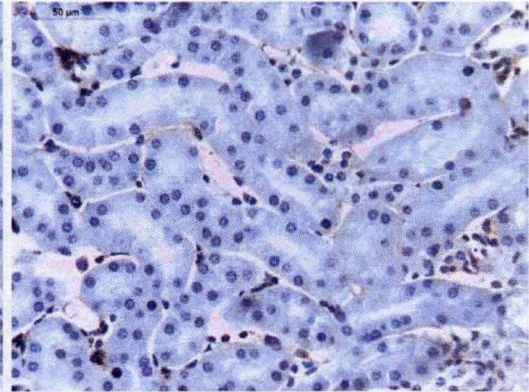
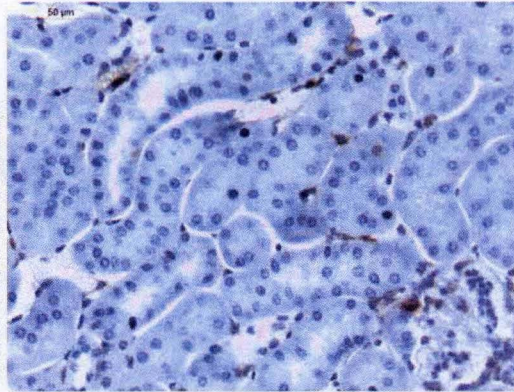
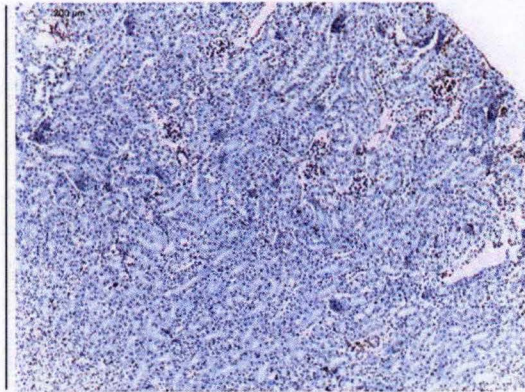
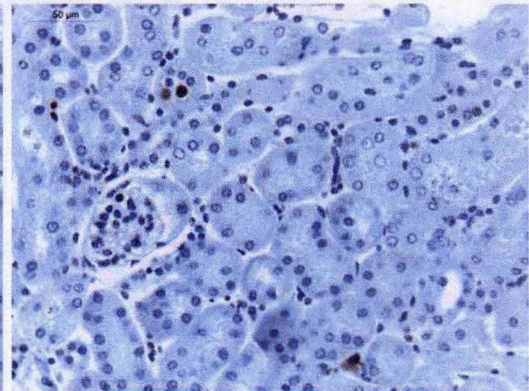
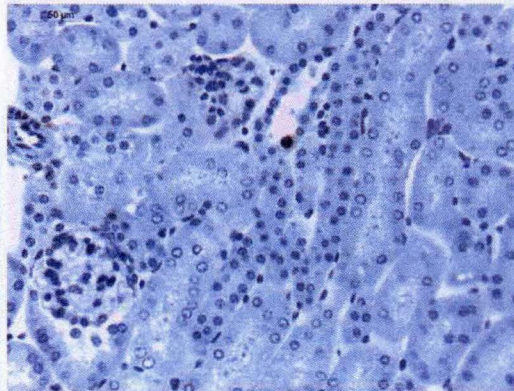
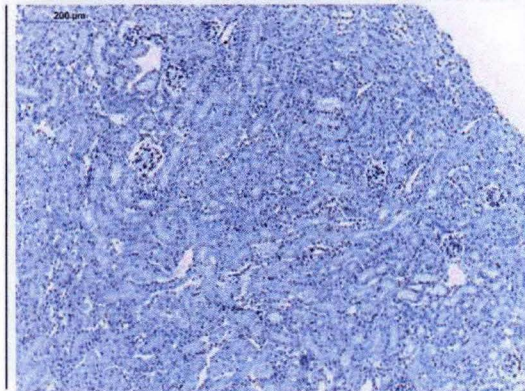


Figure 23A. Marquage de PCNA sur des coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H12 et H24. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x

CTL



H48



H72

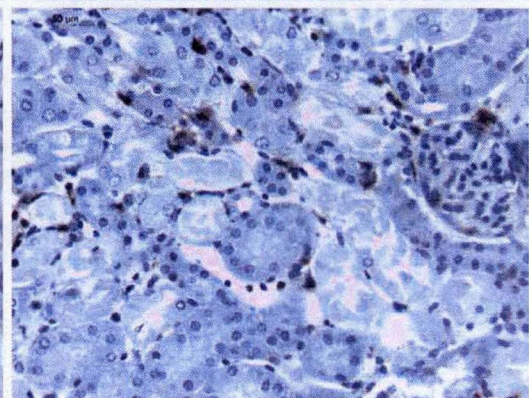
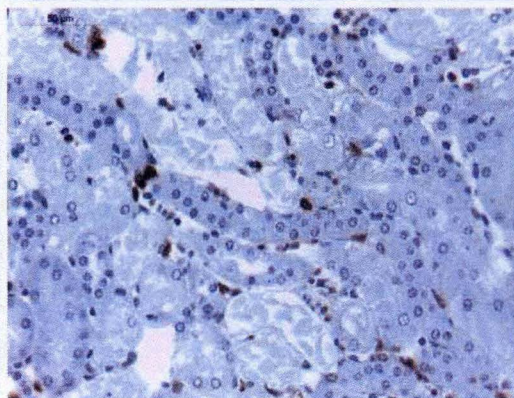
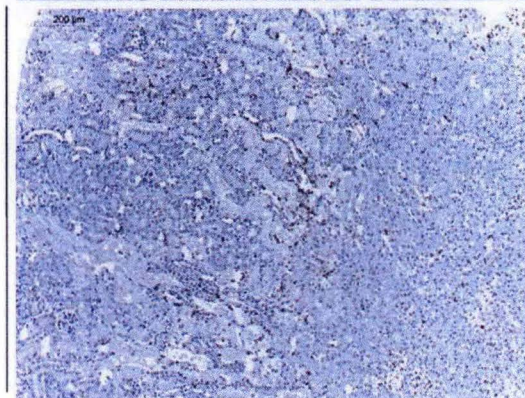
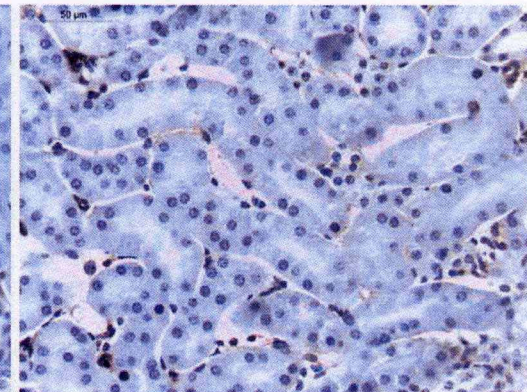
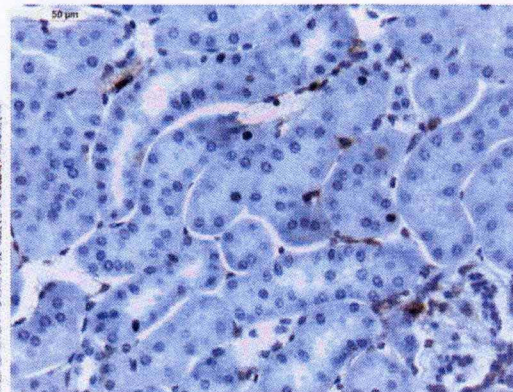
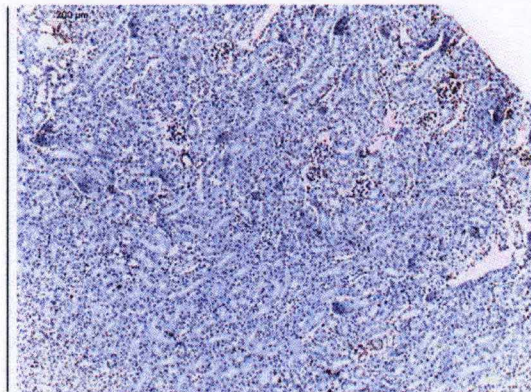
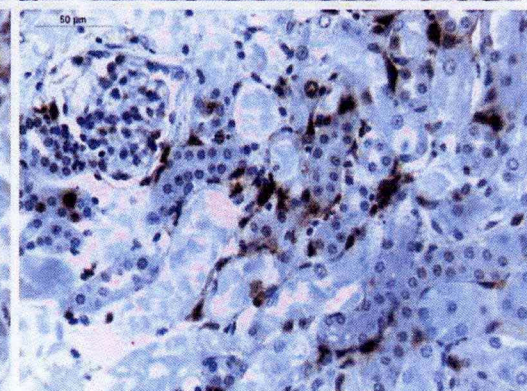
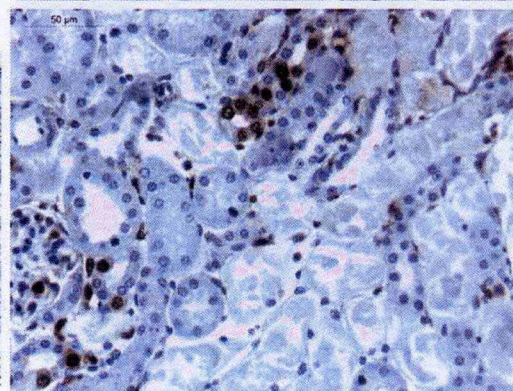
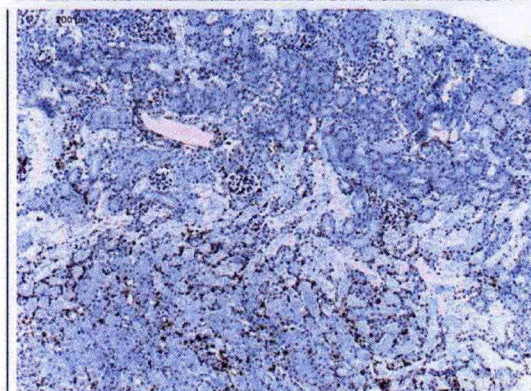


Figure 23B. Marquage de PCNA sur des coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H48 et H72. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x

CTL



H96



D10

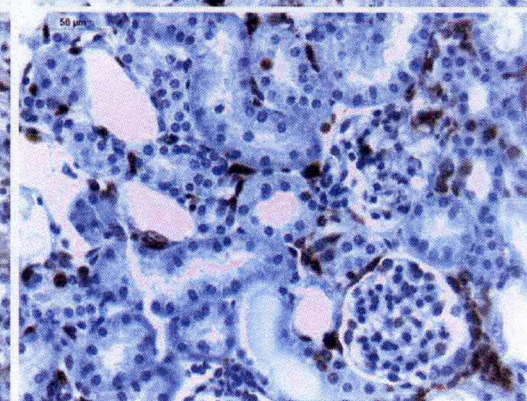
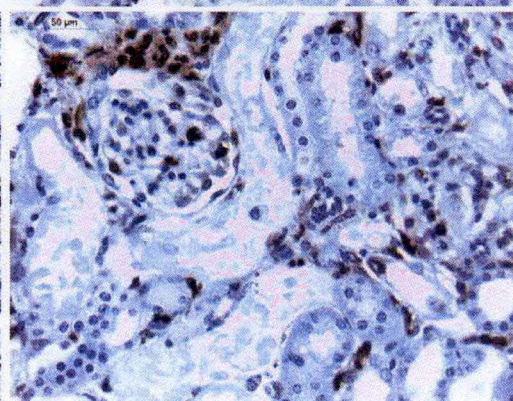
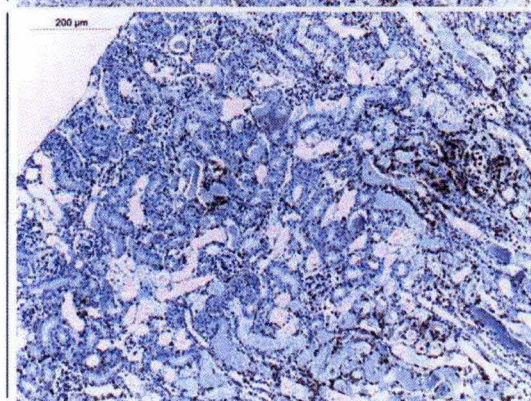


Figure 23C. Marquage de PCNA sur des coupes de reins des groupes expérimentaux CTL, H12 et H24. À gauche, grossissement 100x ; au milieu et à droite, grossissement 400x

I.4. Évaluation de l'inflammation

Afin d'évaluer le processus d'inflammation, l'expression relative de l'ARNm de *TNF α* , *MCP1*, *IL1 β* et *IL6* a été étudiée. Pour commencer, l'expression relative de l'ARNm de *TNF α* (Figure 24A) et de *MCP1* (Figure 24B) est significativement plus élevée dans les groupes H72 et J10 en comparaison avec le groupe contrôle ($p \leq 0,001$ H72 et J10 vs le groupe CTL). Ensuite, les cytokines *IL1 β* (Figure 24C) et *IL6* (*fold increase* : 402,3) (Figure 24D) présentent un profil similaire avec une augmentation significative de leur expression relative à H72, par rapport au groupe contrôle ($p \leq 0,001$ H72 vs le groupe CTL). Au niveau de l'expression relative de l'ARNm d'*IL6*, une augmentation est également observée à H48 (*fold increase* : 75,5), H96 (*fold increase* : 72,6) et J10 (*fold increase* : 92,9). Cette augmentation de l'expression relative de l'ARNm n'est cependant pas significative.

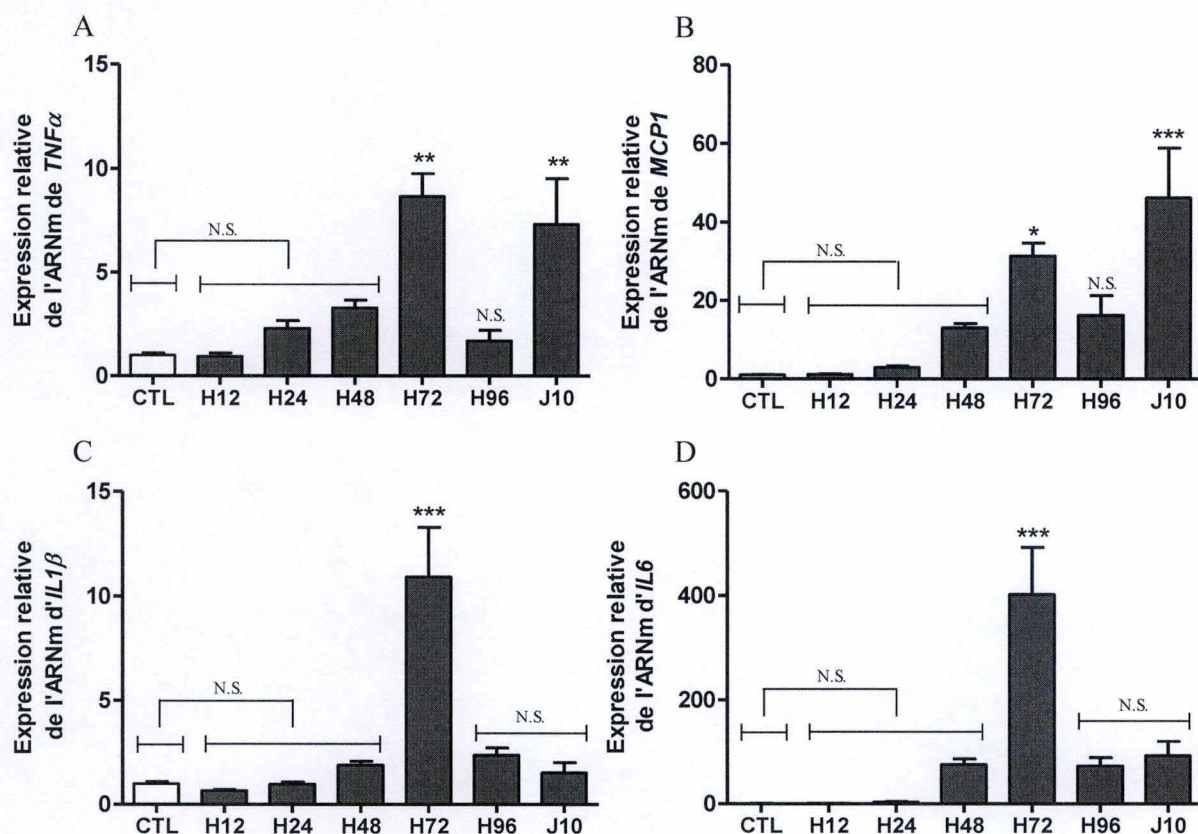


Figure 24. Évaluation de l'inflammation pour chaque groupe expérimental avec l'expression relative de l'ARNm des gènes (A) *TNF α* , (B) *MCP1*, (C) *IL1 β* et (D) *IL6*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

I.5. Évaluation de la réponse anti-oxydante

Afin d'évaluer la réponse anti-oxydante suite à une intoxication aux AA, l'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* (« Nuclear factor erythroid 2-Related Factor »), *HO-1* (« Heme oxygenase 1 »), *SOD1* (« Superoxide Dismutase 1 ») et *SOD2* (« Superoxide Dismutase 2 ») a été évaluée. La protéine NRF-2 est un facteur de transcription qui est actif lors du stress oxydatif et qui induit l'expression de gènes tels que l'*HO-1* ou la *SOD1*, deux protéines dont l'activité

permet de diminuer le stress oxydatif cellulaire. De même, la SOD2 est une enzyme qui permet également de lutter contre le stress oxydant en convertissant des radicaux libres en peroxyde d'hydrogène.

Les résultats obtenus indiquent que l'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* (Figure 25A) est significativement augmentée à H72, par comparaison au groupe contrôle ($p \leq 0,05$ H72 vs le groupe CTL). Ensuite, l'HO-1 (Figure 25B) présente une expression relative de son ARNm qui est significativement augmentée aux temps H12, H24 et H72 ($p \leq 0,01$ H12 et H24 vs le groupe contrôle ; $p \leq 0,001$ H72 vs le groupe CTL) et significativement diminuée à H96, comparé au groupe contrôle ($p \leq 0,01$ H96 vs le groupe CTL). Quant à l'expression relative de l'ARNm de *SOD1* (Figure 25C), une diminution significative est observée depuis le début de l'intoxication ($p \leq 0,001$ H12 vs le groupe CTL), laquelle se poursuit aux timings H48, H72 ($p \leq 0,001$ H48 et H72 vs le groupe CTL), H96 et J10 ($p \leq 0,001$ H96 et J10 vs le groupe CTL). Cependant, aucune différence significative n'est observable entre H24 et le groupe contrôle. Comme l'illustre la Figure 25D, l'expression relative de l'ARNm de *SOD2* présente un profil similaire avec une diminution significative de l'expression du gène depuis H12 jusqu'à la fin du protocole ($p \leq 0,001$ H12, H48 et H72 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,01$ H24 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ H96 et J10 vs le groupe CTL).

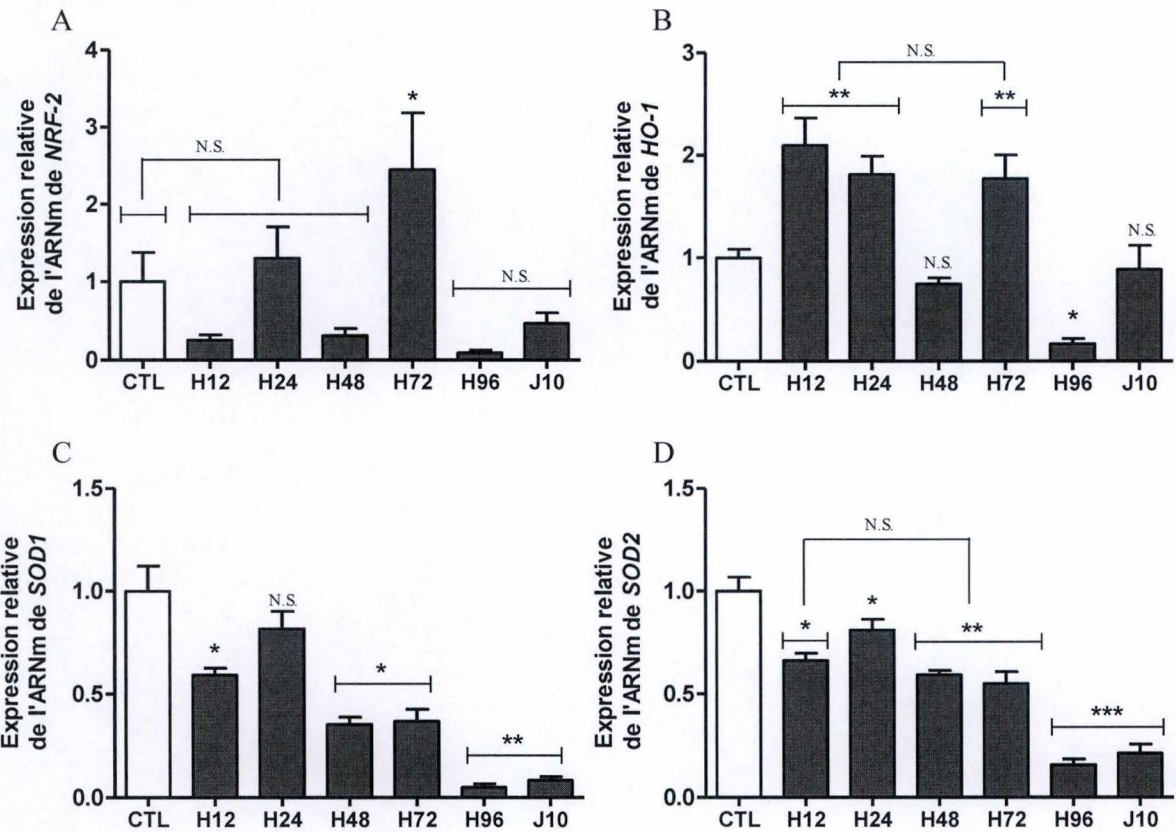


Figure 25. Évaluation du stress oxydatif pour chaque groupe expérimental avec l'expression relative des gènes (A) *NRF-2*, (B) *HO-1*, (C) *SOD1* et (D) *SOD2*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

I.6. Évaluation de l'expression des sirtuines

L'évolution des sirtuines a été évaluée *via* l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1/3* ainsi que *via* leur expression protéique. Pour *SIRT1* (Figure 26A), l'expression relative de l'ARNm oscille avec une diminution significative aux timings H12, H48, H96 et J10, comparé au groupe contrôle ($p \leq 0,001$ H12, H48, H96 et J10 vs le groupe CTL). L'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* (Figure 26B) diminue progressivement dès le timing H12 et ce jusqu'à la fin du protocole ($p \leq 0,001$ vs le groupe CTL).

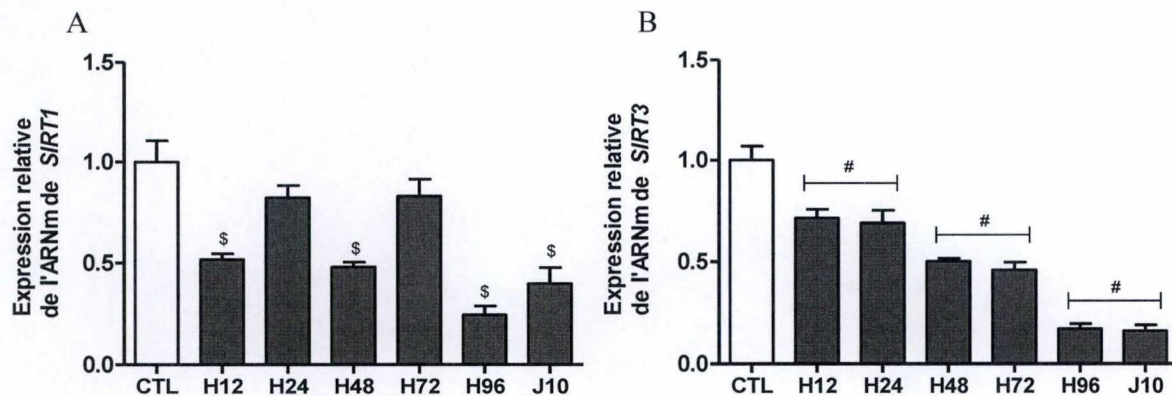


Figure 26. Expression relative de l'ARNm des gènes (A) *SIRT1* et (B) *SIRT3*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. \$ $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; # $p \leq 0,05$ vs les autres groupes.

L'expression protéique de *SIRT3* (Figure 27) présente une diminution significative depuis H96 jusqu'à J10 ($p \leq 0,05$ H96 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ J10 vs le groupe CTL).

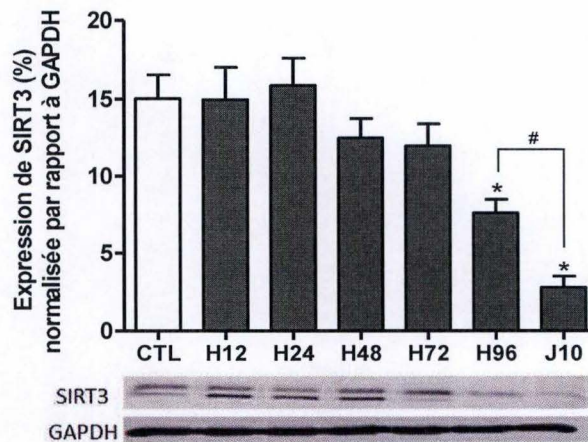


Figure 27. Expression protéique de *SIRT3*, normalisée par rapport à la GAPDH. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=8$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; # $p \leq 0,05$ H96 vs J10.

II. Expérimentation *in vitro*

II.1. Effets des AA sur la viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la toxicité des AA sur les cellules HK-2 en culture, un test MTT a été réalisé sur des cellules incubées durant 1h30 (H1.5), 3h (H3), 6h (H6), 12h (H12), 24h (H24) et 48h (H48) à des concentrations de 10, 25, 50, 75 ou 100 μM (Figure 28). Les pourcentages de viabilité cellulaire en fonction du temps d'incubation et de la concentration testés sont les suivants :

- À H1.5, aucune mortalité cellulaire n'est observée, quelle que soit la concentration appliquée ;
- À H3, une viabilité cellulaire de 100% est observée à une concentration de 10 μM . En ce qui concerne les autres concentrations testées, une viabilité cellulaire de 90% est observée ;
- À H6, une viabilité cellulaire de 80% est conservée pour toutes les concentrations ;
- À H12, une viabilité cellulaire d'approximativement 75% est observable pour une intoxication aux concentrations de 10, 25 et 50 μM . Pour les concentrations de 75 et 100 μM , une viabilité cellulaire de 70% est conservée ;
- À H24, les concentrations de 10 et 25 μM conservent une viabilité cellulaire de 55% tandis que pour les concentrations de 50, 75 et 100 μM , uniquement 45% de viabilité cellulaire sont observables ;
- À H48, 30% de viabilité cellulaire sont observables pour la concentration de 10 μM , 25% pour la concentration de 25 μM et 20% pour les concentrations de 50, 75 et 100 μM .

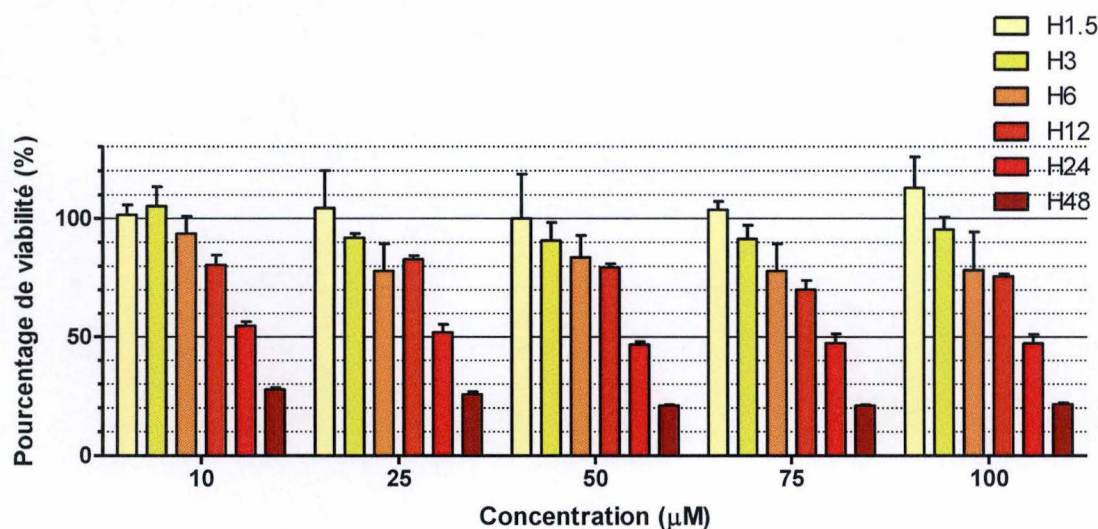


Figure 28. Pourcentages de viabilité cellulaire par rapport au contrôle en fonction du temps d'intoxication et de la concentration en acides aristolochiques. *Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=3$ pour chaque groupe.*

Afin de consolider ces résultats, un test LDH a été réalisé sur des cellules incubées pendant 3, 6, 12 et 24 heures en présence des AA à des concentrations de 10, 25, 50, 75 et 100 μM (Figure 29).

- À H3, les concentrations de 10 et 25 μM induisent une cytotoxicité identique à la mortalité cellulaire observée chez les cellules contrôles. Les concentrations de 50, 75 et 100 μM induisent respectivement une cytotoxicité d'approximativement 12,5, 16 et 15% contre une mortalité cellulaire contrôle de 11% ;
- À H6, aucune différence n'est observable entre la mortalité cellulaire du groupe contrôle et la cytotoxicité des groupes intoxiqués aux AA (17,5%). Cependant, la libération de LDH est relativement élevée pour les cellules contrôles ;
- À H12, les concentrations de 10 et 75 μM induisent une cytotoxicité d'environ 13% tandis que pour les concentrations de 25 et 50 μM , une cytotoxicité de 14% est observable. De plus, à ce timing, la concentration de 100 μM induit une cytotoxicité de 15,5%, contre une mortalité cellulaire naturelle de 12,5% ;
- À H24, une mortalité cellulaire naturelle de 20% est observable dans chez les cellules contrôles. Les concentrations de 10 et 75 μM induisent une cytotoxicité de 24,5% tandis que pour les concentrations de 25, 50 et 100 μM , une cytotoxicité de, respectivement, 30, 28 et 23% est observable.

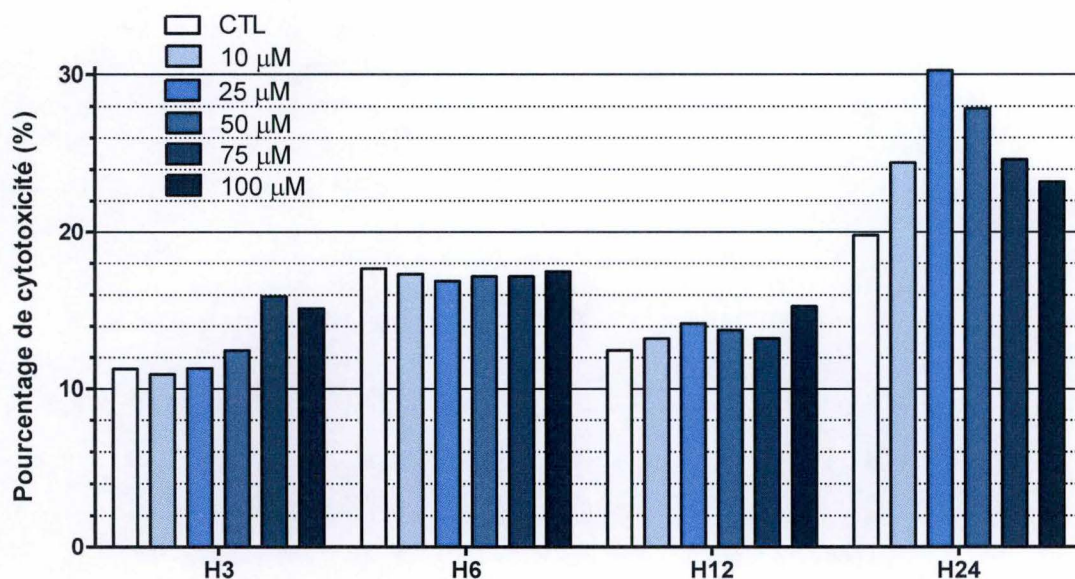


Figure 29. Pourcentage de cytotoxicité en fonction du temps d'intoxication et de la concentration en acides aristolochiques.

Des micrographies des cellules incubées dans ces conditions prises en microscopie optique à contraste de phase sont disponibles en Annexes.

II.2. Protocole 1

Des cellules HK-2 ont été initialement incubées à une concentration de 50 μM durant les timings **H3**, **H6**, **H12** et **H24**. Dans cette expérience, les altérations cellulaires, la réponse anti-oxydante et l'expression des SIRT1/3 ont été évaluées. Sur les micrographies disponibles en Figure 30, une diminution de la densité cellulaire associée à une augmentation du nombre de cellules flottantes est observée pour les cellules incubées en présence d'AA.

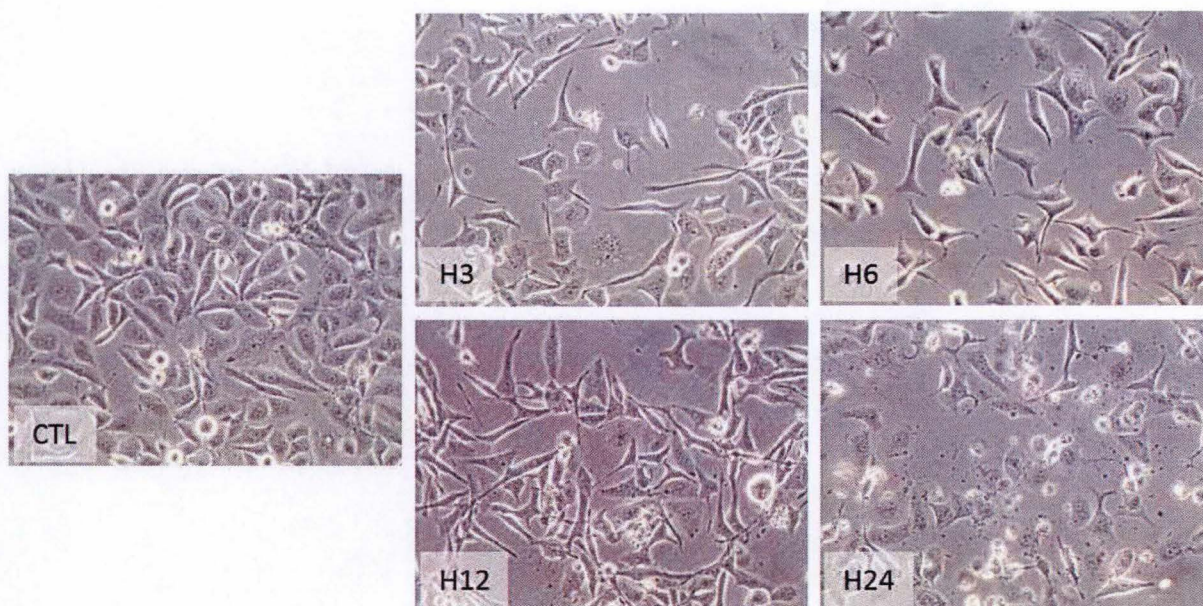


Figure 30. Micrographies des cellules intoxiquées pendant des temps croissants (3, 6, 12 et 24 heures) avec une concentration de 50 µM d'AA. Grossissement 200x.

a) Évaluation des altérations cellulaires

Altérations cellulaires

Afin d'évaluer la toxicité des AA pour les cellules HK-2, l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1* a été étudiée. Le gène codant pour cette protéine est surexprimé dans les tubules proximaux du rein lors du stress rénal aigu et constitue un biomarqueur des altérations des cellules épithéliales tubulaires proximales (HK-2). Une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1* (Figure 31) est observée transitoirement à H3 ($p \leq 0,001$ H3 vs le groupe CTL). Une diminution de cette expression est ensuite observée avec une expression relative de l'ARNm de *KIM-1* significativement diminuée aux timings H12 et H24, comparé au contrôle ($p \leq 0,001$ H12 et H24 vs le groupe CTL).

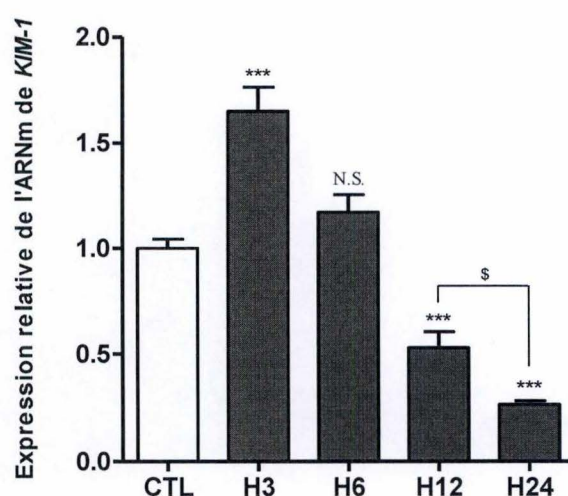


Figure 31. Expression relative de l'ARNm du gène de *KIM-1* dans des cellules incubées en présence d'AA pendant des temps croissants. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=6$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type 1 suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. \$ $p \leq 0,05$ H12 vs H24 ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif H6 vs le groupe contrôle.

Altérations mitochondriales

Dans le but d'évaluer l'impact de l'intoxication aux AA sur les cellules HK-2, un marquage des mitochondries avec la sonde MitoTracker® a été réalisé et visualisé en microscopie confocale (Figures 32A et 32B). Ce marquage permet notamment d'observer la morphologie du réseau mitochondrial chez des cellules vivantes. Sur base des micrographies, l'« *Aspect ratio* » et le ratio entre le nombre d'extrémités libres et le nombre de branchements ont été calculés. Ces deux ratios permettent d'estimer la fragmentation du réseau mitochondrial. Celle-ci est particulièrement intéressante à étudier car un réseau mitochondrial fragmenté est relié à une diminution de la production d'ATP, ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose. Tout d'abord, l'« *Aspect ratio* » (Figure 32C) est calculé sur base de la longueur des mitochondries par rapport à leur largeur. Ce ratio diminue significativement à H24 ($p \leq 0,05$ H24 vs le groupe CTL), ce qui indique une fragmentation du réseau mitochondrial. Ce résultat est corroboré par l'analyse du ratio entre le nombre d'extrémités libres et le nombre de branchements (Figure 32D), lequel est significativement augmenté à H24, comparé au contrôle ($p \leq 0,05$ H24 vs le groupe CTL).

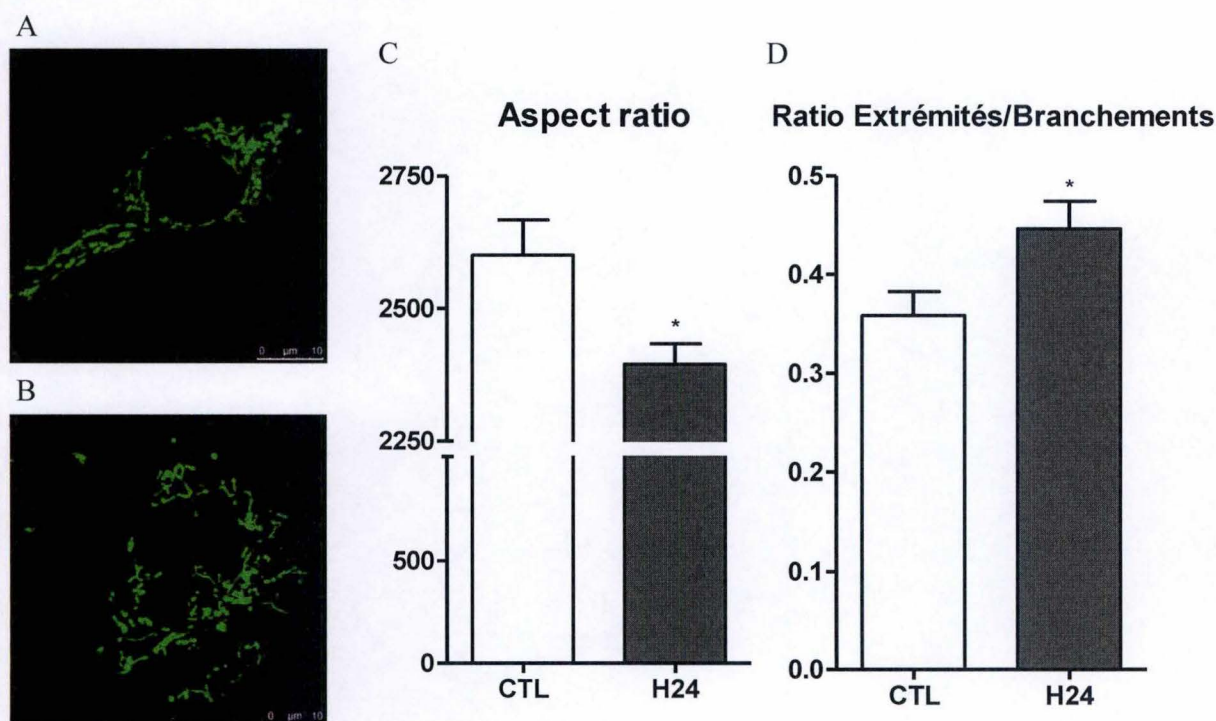


Figure 32. Morphologie mitochondriale visualisée en microscopie confocale chez des cellules contrôles (A) et incubées durant 24 heures avec une concentration en AA de 50 μ M (B). En C, l'« *Aspect ratio* » et en D, le ratio entre les extrémités libres et les branchements. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=1$ et 30 cellules analysées pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test *t*-Student. * $p \leq 0,05$ vs le groupe contrôle.

b) Évaluation de la prolifération cellulaire

Tout d'abord, une évaluation de la concentration totale en protéines (Figure 33) a été réalisée pour chaque échantillon. Une diminution significative d'environ 30% de cette concentration est observée depuis H3 et jusqu'à la fin du protocole ($p \leq 0,01$ vs CTL). Ce test tient évidemment compte de l'intégration de la toxicité et de la prolifération cellulaire, même si la prolifération est probablement relativement faible au cours d'une période de 24 heures, temps correspondant à un cycle cellulaire.

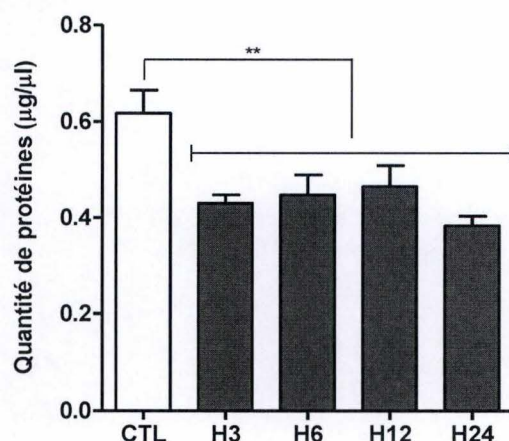


Figure 33. Concentration en protéines (µg/µl) récupérées pour des cellules incubées ou non en présence d'AA à 50 µM durant 3, 6, 12 ou 24 heures. Les données sont exprimées en concentrations protéiques et représentent les moyennes \pm S.E.M. ; $n=6$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. ** $p \leq 0,01$ vs CTL.

Dans le but d'estimer le phénomène de réplication de l'ADN durant l'intoxication des cellules HK-2 par les AA, l'expression relative de l'ARNm de *PCNA* (« Proliferative Cell Nuclear Antigen ») et l'expression protéique de PCNA ont été évaluées. Dans un premier temps, l'expression relative de l'ARNm de *PCNA* (Figure 34) diminue significativement ($p \leq 0,001$ H3 et H6 vs le groupe CTL) avant d'augmenter à H24 ($p \leq 0,05$ H24 vs le groupe CTL).

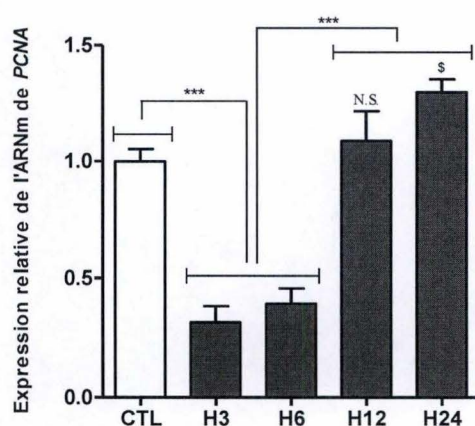


Figure 34. Expression relative de l'ARNm du gène de *PCNA*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=6$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. \$ $p \leq 0,05$ H24 vs le groupe contrôle ; *** $p \leq 0,001$ H3 et H6 vs les autres groupes ; N.S. Non significatif H12 vs le groupe contrôle.

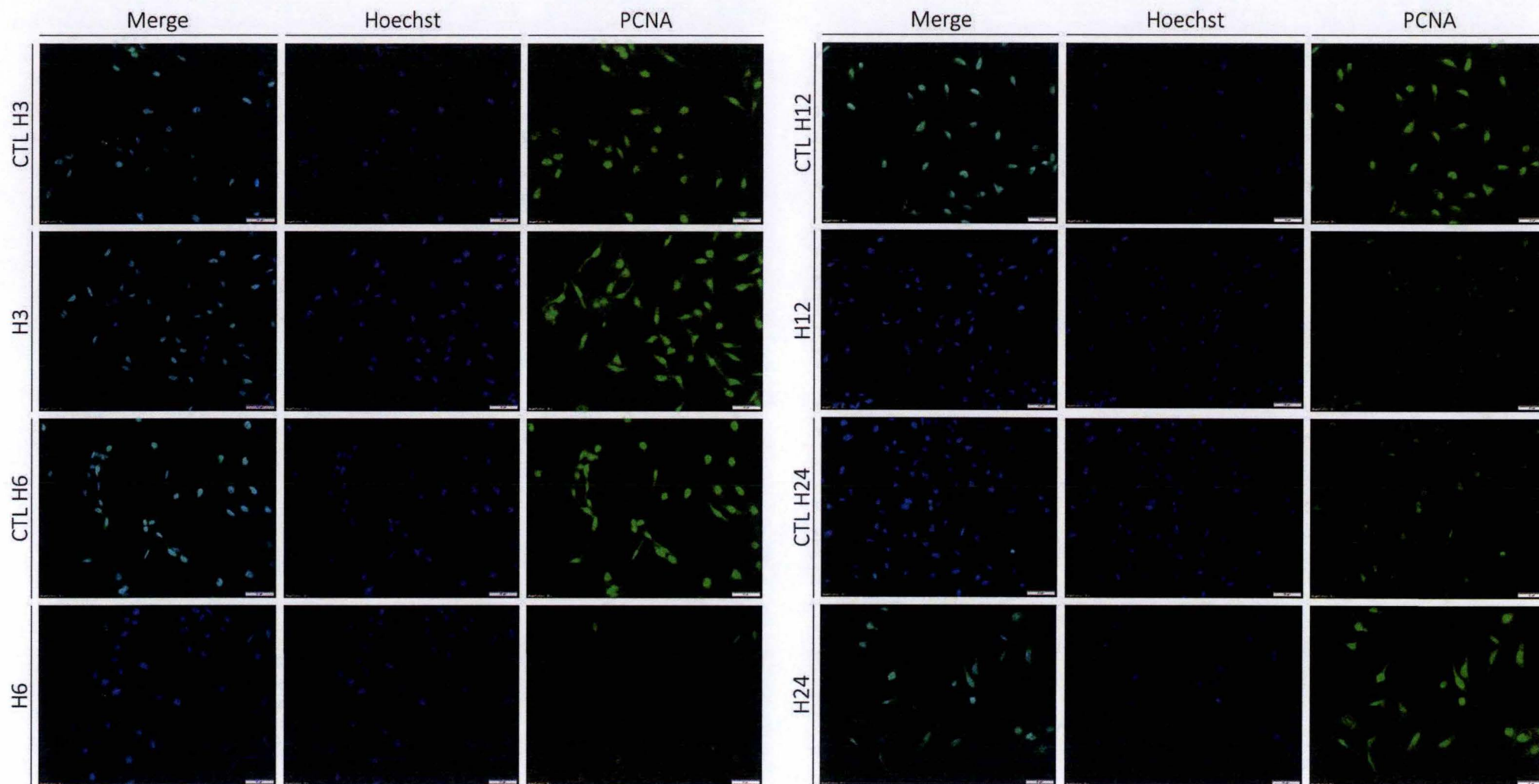


Figure 35. Marquage en immunofluorescence des noyaux (marquage Hoechst, en bleu) et de la protéine PCNA (en vert) aux différents temps d'incubation des cellules en présence de milieu contenant des AA à 50 μ M. Un contrôle constitué de cellules non-traitées a également été réalisé pour chaque timing. Grossissement 200x.

Du point de vue de l'expression protéique, un marquage de la protéine en immunofluorescence a été réalisé (Figure 35). Une diminution significative du nombre de noyaux positifs pour le marquage PCNA (Figure 36) est observable aux timings H6 et H12 ($p \leq 0,01$ H6 vs CTL ; $p \leq 0,001$ H12 vs CTL). À H24, le marquage est significativement augmenté en comparaison avec les cellules contrôles, lesquelles présentent un marquage de PCNA diminué ($p \leq 0,01$ H24 vs CTL H24).

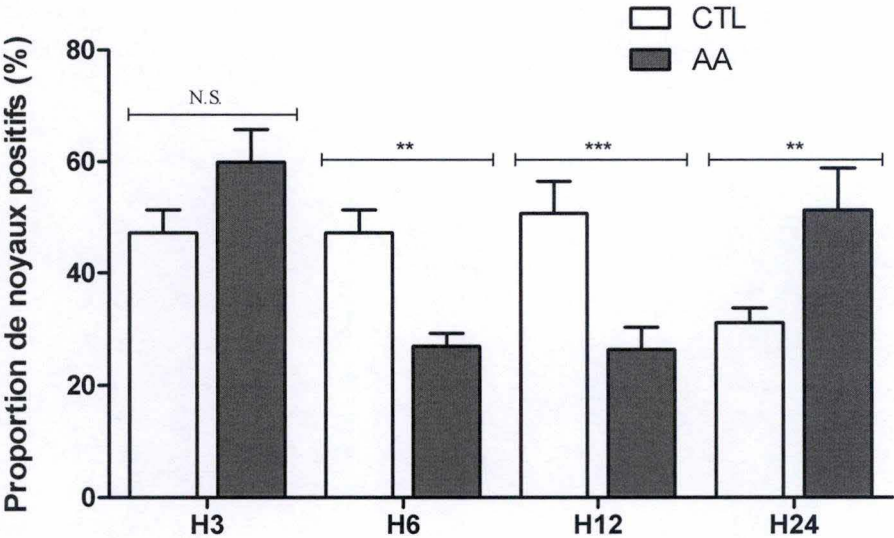


Figure 36. Proportion de noyaux positifs pour le marquage PCNA en immunofluorescence. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=1$ et 10 sections analysées pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type II suivie d'un test de Bonferroni pour la comparaison multiple. ** $p \leq 0,01$ H6 et H12 vs CTL ; *** $p \leq 0,001$ H12 vs CTL ; N.S. Non significatif H3 vs CTL.

c) Évaluation de la réponse anti-oxydante

Afin d'évaluer la réponse anti-oxydante, l'expression relative de l'ARNm des gènes *NRF-2*, *HO-1*, *SOD1* et *SOD2* a été évaluée. Tout d'abord, l'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* (Figure 37A) augmente significativement aux timings H6 et H12 lorsqu'elle est comparée à l'abondance du transcrit dans le groupe contrôle ($p \leq 0,01$ H6 et H12 vs le groupe CTL). Ensuite, l'expression d'*HO-1* (Figure 37B) augmente progressivement au cours de la durée d'intoxication par les AA ($p \leq 0,05$ H6 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,01$ H12 vs le groupe CTL ; $p \leq 0,001$ H24 vs le groupe CTL). Quant à l'expression relative de l'ARNm de *SOD1* (Figure 37C), celle-ci est significativement diminuée depuis le début de l'intoxication lorsqu'elle est comparée à l'abondance retrouvée pour les cellules contrôles ($p \leq 0,001$ H3, H6, H12 et H24 vs le groupe CTL). Finalement, l'expression relative de l'ARNm de *SOD2* (Figure 37D) est significativement augmentée au timing H3 ($p \leq 0,001$ H3 vs le groupe CTL) avant de revenir à un niveau d'expression initial.

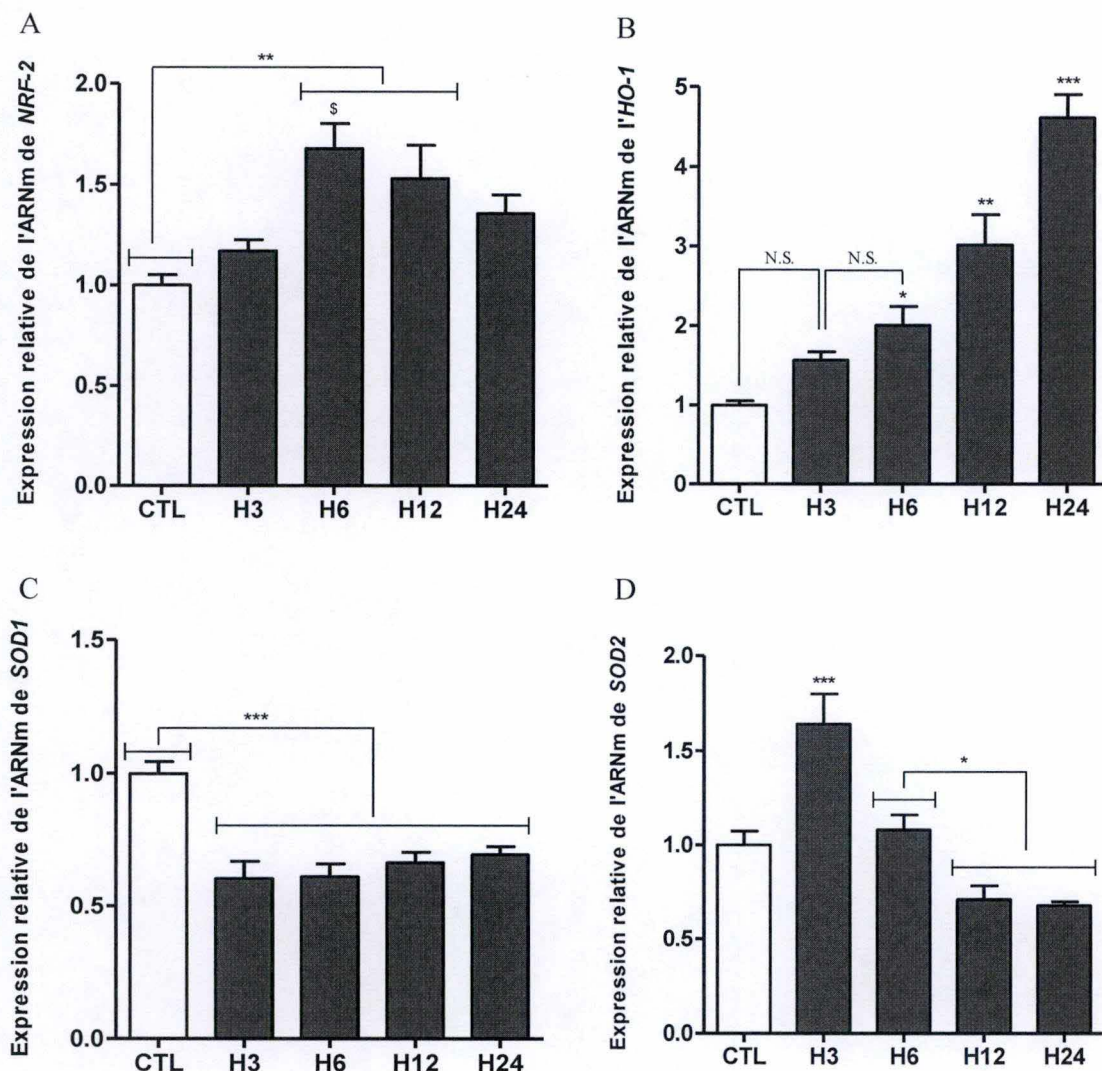


Figure 37. Expression relative de l'ARNm des gènes (A) *NRF-2*, (B) *HO-1*, (C) *SOD1* et (D) *SOD2*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=6$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. \$ $p \leq 0,05$ H6 vs H3 ; # $p \leq 0,05$ H6 vs H12 et H24 ; * $p \leq 0,05$ H6 vs CTL ; ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif H3 vs CTL et H6.

d) Évaluation de l'expression des sirtuines

Dans le but d'étudier l'effet des AA sur le niveau d'expression des sirtuines, l'expression relative de l'ARNm, ainsi que l'expression protéique des SIRT1/3 ont été évaluées. Comme l'illustre la Figure 38A, l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1* est significativement augmentée à partir du timing H12 ($p \leq 0,001$ H12 et H24 vs le groupe CTL). Dans les mêmes conditions, l'expression relative de *SIRT3* (Figure 38B) est significativement diminuée à H6, par rapport au groupe contrôle ($p \leq 0,05$ H6 vs le groupe CTL). *A contrario*, une légère augmentation de l'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* est observée à H24 ($p \leq 0,05$ H24 vs le groupe CTL).

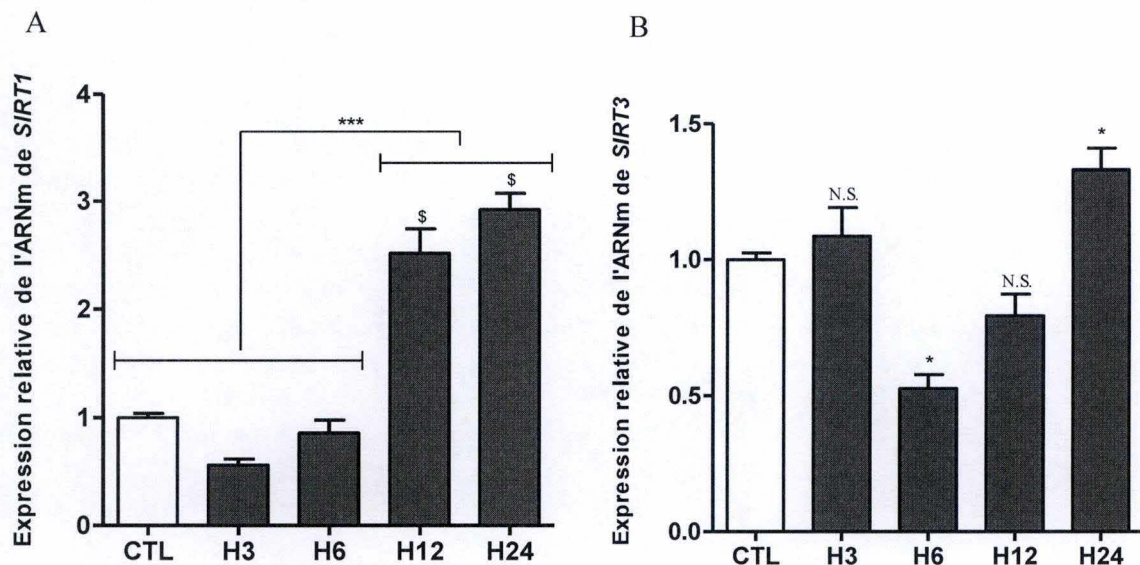


Figure 38. Expression relative de l'ARNm des gènes (A) *SIRT1* et (B) *SIRT3*. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=6$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; # $p \leq 0,05$ H12 vs H24 ; *** $p \leq 0,001$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif H3 et H12 vs le groupe contrôle.

Les résultats obtenus pour l'expression protéique relative des *SIRT1* et *SIRT3*, sont illustrés en Figures 39A et 39B. Une augmentation significative de l'expression de *SIRT1* est observée au timing H24 ($p \leq 0,05$ vs le groupe CTL). Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes expérimentaux pour l'expression protéique

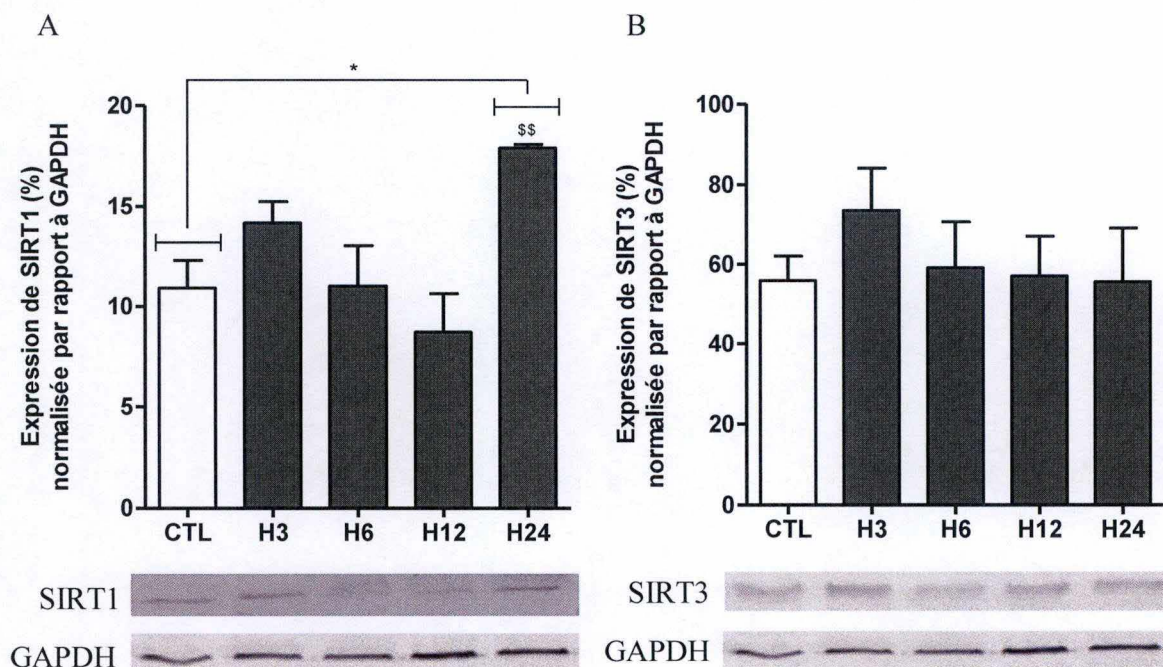


Figure 39. Abondance protéique de (A) *SIRT1* et (B) *SIRT3*, normalisée par rapport à la GAPDH. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=3$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; \$\$ $p \leq 0,01$ H24 vs H12.

II.3. Protocole 2

Afin d'étudier l'intoxication des cellules par des AA durant de plus longs timings, un second protocole expérimental a été réalisé. Une concentration plus faible a été choisie pour ce protocole afin de permettre la conservation de suffisamment de matériel biologique pour les analyses protéiques et pour les analyses de l'expression relative de l'ARNm. Durant ce second protocole, les cellules HK-2 ont donc été incubées pendant 24 heures (**H24**), 48 heures (**H48**), 72 heures (**H72**) et 96 heures (**H96**) avec une concentration de **10 μ M**. Dans cette deuxième expérience, une évaluation des altérations morphologiques des cellules en microscopie optique à contraste de phase et l'analyse de l'expression relative de SIRT1 ont été réalisés.

Sur les micrographies disponibles en Figure 40, une augmentation du nombre de cellules flottantes associée à une diminution de la densité cellulaire est observée et ce dès le timing H24.

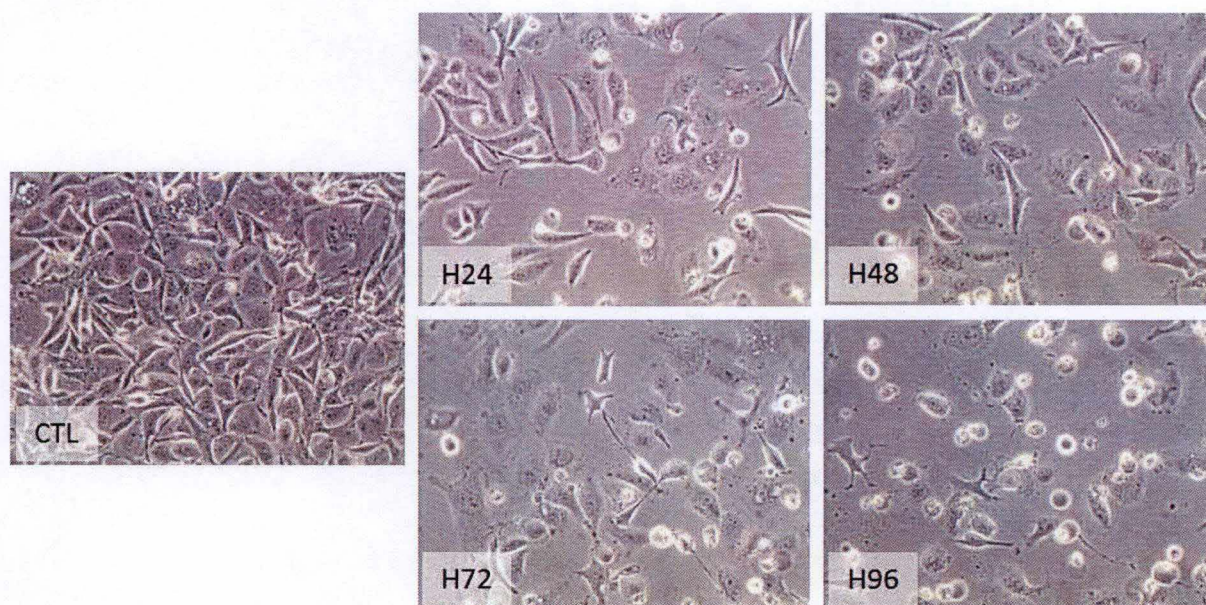


Figure 40. Micrographies des cellules intoxiquées pendant des temps croissants (24, 48, 72 et 96 heures) avec une concentration de 10 μ M d'AA. Grossissement 200x.

a) Évaluation des altérations cellulaires

Tout comme pour le premier protocole expérimental, l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1* (Figure 41) a été quantifiée. Une diminution significative de cette expression relative du transcrit est observée dès le temps d'incubation H24 ($p \leq 0,01$ vs le groupe CTL).

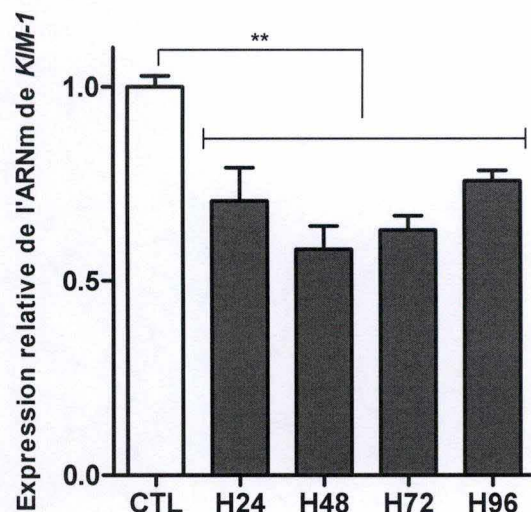


Figure 41. Expression relative de l'ARNm du gène de *KIM-1* durant les divers timings. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; $n=5$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. ** $p \leq 0,01$ vs les autres groupes.

b) Évaluation de l'expression de SIRT1

L'évolution de SIRT1 a été évaluée *via* l'analyse de l'expression relative de son ARNm et *via* son expression protéique. Une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1* (Figure 42A) est observée depuis le timing H24 et jusqu'à la fin du protocole ($p \leq 0,001$ vs le groupe CTL). Cette augmentation est également observable au niveau protéique (Figure 42B) et est significative à partir du timing H72 ($p \leq 0,05$ H72 et H96 vs le groupe CTL).

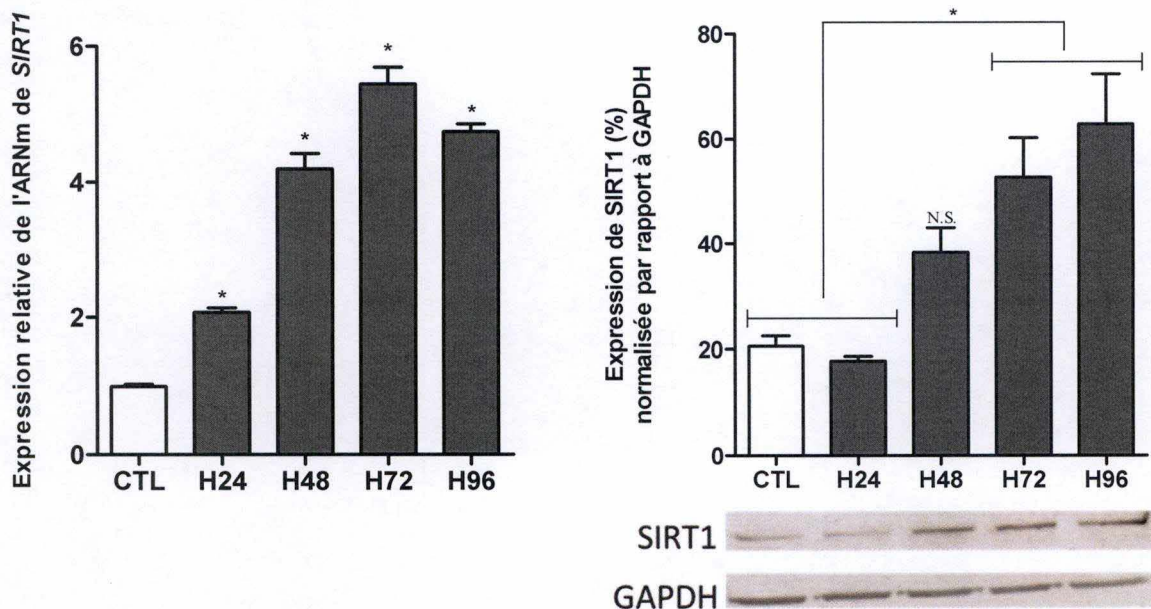


Figure 42. (A) Expression relative de l'ARNm du gène *SIRT1* et (B) expression protéique de SIRT1, normalisée par rapport à la GAPDH. Les données sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ; (A) $n=5$ et (B) $n=3$ pour chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une analyse de variance de type I suivie d'un test de Newman-Keuls pour la comparaison multiple. * $p \leq 0,05$ vs les autres groupes ; N.S. Non significatif vs les autres groupes.

Discussion

Depuis la première caractérisation de la néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) en 1992, de nouveaux cas de NAA ont été reportés en Europe, aux États-Unis, en Australie et dans de nombreux pays asiatiques. En effet, 300 cas de NAA ont été reportés à Pékin entre 1997 et 2006 et près de 40% de la population taïwanaise est pressentie comme ayant consommé des produits contenant des acides aristolochiques (AA) (Gökmen *et al.*, 2013). Malgré cela, la prévalence de cette néphrotoxicité reste très difficile à évaluer. En effet, les plantes de la famille *Aristolochia* font partie de la médecine traditionnelle chinoise, et sont donc utilisées pour traiter de nombreuses pathologies telles que les morsures de serpent, l'eczéma ou encore l'hépatite. À cela s'ajoute le manque de recensement dans certains pays, ainsi que la facilité à se procurer des produits contenant des AA *via* Internet. De ce fait, la NAA constitue un problème de santé mondiale pour lequel aucun traitement n'est disponible à ce jour (Jadot *et al.*, 2017).

Deux caractéristiques de la NAA qui ont été reportées ultérieurement concernent une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif (Jadot *et al.*, 2017 ; Pozdzik *et al.*, 2010). Dans ce cadre, notre intérêt s'est porté sur l'étude des sirtuines 1 et 3 (SIRT1/3), lesquelles possèdent une activité enzymatique de déacétylation des protéines. Cette activité permet à SIRT1 de diminuer l'inflammation et de lutter, en coordination avec SIRT3, contre le stress oxydatif (Wakino *et al.*, 2015). De plus, les SIRT1/3 ont été reportées comme protectrices dans plusieurs modèles *in vivo* de néphropathie aiguë, tels que la néphropathie induite par le cisplatine (Morigi *et al.*, 2015) ou par choc septique (Xu *et al.*, 2016).

En effet, dans un modèle de néphropathie induite par injection sous-cutanée de cisplatine (17,4 mg/kg de poids corporel), des souris *SIRT3*^{-/-} femelles sont apparues comme étant moins résistantes au stress rénal aigu par rapport aux souris contrôles (Morigi *et al.*, 2015). Dans cette même étude, l'impact du cisplatine sur le réseau mitochondrial de cellules épithéliales de tubules proximaux provenant d'un rein humain (cellules RPTEC) sur-exprimant SIRT3 a été évalué. Cette surexpression permettait de diminuer la fragmentation du réseau mitochondrial, réduisant ainsi la sensibilité des cellules au cisplatine (Morigi *et al.*, 2015). Quant à SIRT1, celle-ci a été reportée comme étant sous-exprimée, avec une activité enzymatique moindre dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë induite par choc septique chez des rats Sprague-Dawley SPF (« *Specific Pathogen Free* ») (Xu *et al.*, 2016). Dans cette même étude, l'activation de l'expression et de l'activité de SIRT1 par le resvératrol a eu pour effet d'inhiber l'apoptose, augmentant la survie des rats et diminuant les atteintes mitochondriales (Xu *et al.*, 2016).

Le but de ce mémoire est donc de caractériser le niveau d'expression de ces deux sirtuines suite à une intoxication aux AA. Pour ce faire, deux approches expérimentales ont été développées. La première approche est un modèle *in vivo* de NAA développé chez la souris C57BL/6 mis précédemment au point dans notre laboratoire. La seconde approche est un modèle *in vitro* d'intoxication de cellules épithéliales tubulaires proximales humaines (cellules HK-2) aux AA.

I. Expérimentation *in vivo*

La première étape de ce mémoire a été de caractériser notre modèle *in vivo* de NAA induite chez des souris mâles C57BL/6. Pour ce faire, les données métaboliques ainsi que les altérations morpho-fonctionnelles rénales ont été caractérisées.

Tout d'abord, l'absorption de nourriture est significativement diminuée à partir de H72. Cette diminution de la prise d'alimentation a été précédemment reportée par Cosyns *et al.* (2001) dans une étude sur des lapines New-Zealand intoxiquées par injection intrapéritonéale d'un mix AA-I/AA-II (44%/56%, 0,1 mg/kg de poids corporel) pendant 17 mois. Ensuite, une augmentation significative de la consommation d'eau aux timings H72 et J10 a été observée dans notre modèle. Cette augmentation est en relation avec une élévation significative de la diurèse et une diminution de l'osmolarité urinaire, toujours à partir de H72. Des résultats similaires ont été reportés par Declèves et ses collègues (2016) chez des souris mâles C57Bl/6J intoxiquées par injection intrapéritonéale avec une dose de 2,5 mg/kg de poids corporel d'AA-I. Ces résultats pourraient être expliqués par l'augmentation de l'excrétion des protéines de faible poids moléculaire au cours de l'évolution de la NAA. En effet, plusieurs protéines de faible poids moléculaire telles que la β 2-microglobuline, la *retinol-binding protein* et l' α 1-microglobuline ont été reportées comme étant fortement excrétées chez des patients atteints de NAA (Debelle *et al.*, 2008). Cette augmentation de la concentration en protéines dans la lumière des tubules proximaux se traduit par une pression oncotique plus élevée dans ces tubules, laquelle s'oppose à la réabsorption de l'eau, induisant une augmentation de la diurèse et une diminution de l'osmolarité urinaire (Lacour, 2013). Cette hypothèse est par ailleurs supportée par les résultats obtenus pour la protéinurie, laquelle est significativement augmentée depuis H72 et jusqu'à la fin du protocole. Une augmentation de la protéinurie a également été reportée par Cosyns *et al.* (2001) au cours de leur étude sur la NAA induite chez les lapines.

Les altérations de la fonction rénale ont également été évaluées *via* les mesures des concentrations plasmatiques en urée et en créatinine ainsi que *via* le débit de filtration glomérulaire. Tout d'abord, dans notre modèle expérimental, l'urémie est significativement augmentée à J10. Cette augmentation a également été observée par Nortier *et al.* (2015) chez des patients souffrant de NAA, ainsi que dans un modèle expérimental de NAA induite par injection intrapéritonéale (2,5 ml/kg de poids corporel d'AA-I) chez des souris mâles C3H/He sacrifiées après 9 jours d'intoxication (Shibutani *et al.*, 2007). Dans cette même étude dirigée par Shibutani (2007), une élévation de la créatininémie a été observée à la fin du protocole, comme nous l'avons également observée dans ce mémoire (H72). À ce même timing, ainsi qu'aux temps H96 et J10, le débit de filtration glomérulaire est significativement diminué. Des résultats similaires ont été reportés par Declèves *et al.* (2016), 5 jours après intoxication. En conclusion, l'ensemble de ces paramètres indique des altérations de la fonction rénale, lesquelles apparaissent à partir de 72 heures après le début de l'intoxication.

La caractérisation du modèle expérimental développé au cours de ce mémoire a également été réalisée *via* des analyses de la structure rénale. Ces altérations sont visibles d'un point de vue macroscopique avec une décoloration du cortex au cours du protocole. Les analyses histologiques corroborent ces résultats avec des altérations des tubules proximaux (TP) observables à partir de H12. En effet, à ce timing, les premières altérations observées sont une décoloration des noyaux des cellules des TP, ce qui n'a encore jamais été décrit dans la littérature. Aux timings H24 et H48, ces mêmes cellules présentent une désorganisation de la bordure en brosse et ce, dans certaines zones délimitées. Ces résultats ont été précédemment reportés par Lebeau *et al.* (2005) dans une étude sur des rats Wistar mâles intoxiqués par injection sous-cutanée (10 mg/kg de poids corporel) d'un mix AA-I/AA-II (40/60) durant 35 jours. Dans cette même étude, une nécrose des TP est détectable après 72 heures d'intoxication (Lebeau *et al.*, 2005), comme observé dans notre protocole. À H96, une augmentation de la proportion de tubules nécrotiques se manifeste avec quelques TP qui ont progressé en tubules atrophiques. Pozdzik *et al.* (2008) ont rapporté des résultats similaires dans une étude sur des rats mâles Wistar intoxiqués aux AA par injection sous-cutanée durant 7 à 35 jours. Dans cette étude, une augmentation du nombre de tubules atrophiques est observable à partir de 10 jours

après le début de l'intoxication et cette augmentation se poursuit jusqu'au jour 35 (Pozdzik *et al.* 2008).

Afin d'implémenter les observations des altérations histologiques, l'expression relative de l'ARNm de *NGAL* a été évaluée. En effet, cette protéine est physiologiquement exprimée par les tubules distaux, ou encore par les cellules immunitaires. Durant le stress rénal aigu, son expression augmente considérablement, aussi bien au niveau de l'ARNm qu'en ce qui concerne sa concentration urinaire (Chakraborty *et al.*, 2012 ; Singer *et al.*, 2013). Les résultats obtenus dans ce mémoire indiquent une détérioration de la structure rénale aux timings H72 et J10, associée à une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *NGAL*. Des résultats similaires ont été reportés par Luo *et al.* (2014) chez des rats mâles Sprague-Dawley dont la néphropathie a été induite par injection intramusculaire de sulfate de gentamicine (50 mg/kg de poids corporel). De plus, les résultats obtenus pour les timings H96 et J10 sont similaires à ceux précédemment reportés dans notre laboratoire (Jadot *et al.*, 2017). Pour conclure, l'ensemble des résultats obtenus permettent de mettre en évidence une altération morphologique rénale depuis le timing H72.

Par la suite, la réplication de l'ADN a été mise en évidence à l'aide d'un marquage de PCNA en immunohistochimie. En effet, cette protéine est un cofacteur de l'ADN polymérase qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication. De ce fait, l'expression de cette protéine a été reportée comme étant maximale durant la phase S du cycle cellulaire (Abadie, 2003). Les résultats obtenus dans ce mémoire indiquent une augmentation significative du marquage de PCNA aux timings H96 et J10, comme l'avaient également observé Pozdzik *et al.* (2008) à 5 et 10 jours d'intoxication. Dans leur étude, une augmentation significative du marquage de PCNA avait également été mesurée dès le 2^e jour d'intoxication, ce qui n'a pas été observé dans notre modèle. En conclusion, une augmentation du marquage de PCNA est observée depuis le timing H96, supportant l'hypothèse de la tentative de régénération tubulaire. Cette observation pourrait également être confirmée par un marquage en immunohistochimie de Ki-67, une protéine nécessaire pour la prolifération cellulaire et qui n'est plus détectable dans les cellules quiescentes.

Une autre caractéristique de la NAA est le déclenchement d'un processus inflammatoire lequel contribue ensuite au phénomène de développement d'une fibrose interstitielle. Afin de suivre l'évolution de l'inflammation dans notre modèle expérimental, l'expression relative de l'ARNm de plusieurs cytokines pro-inflammatoires a été évaluée. Tout d'abord, l'expression relative de l'ARNm de *TNF α* est significativement augmentée à H72 et J10. Ces résultats ont été précédemment reportés dans notre laboratoire (Jadot *et al.*, 2017). Ensuite, les résultats obtenus dans ce mémoire pour l'expression relative de l'ARNm de *MCP1* montrent un profil similaire à celle de *TNF α* avec une augmentation significative aux timings H72 et J10. Des résultats similaires ont été observés quant à l'excrétion urinaire de MCP1 après 7 jours d'intoxication aux AA chez des rats mâles Wistar (Pozdzik *et al.*, 2008). Cependant, dans notre modèle, une diminution de l'expression relative de l'ARNm de *TNF α* et de *MCP1* est observée au timing H96 comparé aux timings H72 et J10.

Une hypothèse qui permettrait d'expliquer ces résultats serait une tentative de régénération des reins entre les timings H72 et J10. En effet, plusieurs études indiquent une dédifférenciation des cellules épithéliales des tubules proximaux, laquelle est suivie d'une prolifération accrue de ces cellules afin de combler les espaces laissés par les cellules nécrotiques (Camussi *et al.*, 2010). Cette stimulation de la dédifférenciation et de la prolifération cellulaires serait réalisée par les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses qui réduiraient l'inflammation afin de faciliter le processus de réparation tissulaire (Bonventre & Yang, 2011). Cette diminution de l'inflammation par les sécrétions

paracrines des cellules souches a notamment été observée dans une étude sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez des rats Sprague-Dawley (Tögel *et al.*, 2005). Il est donc possible qu'un tel processus se produise dans notre modèle à H96, ce qui expliquerait la diminution de l'expression relative de l'ARNm de *TNFα* et *MCPI*.

Finalement, les deux cytokines *IL1β* et *IL6* présentent un profil d'expression similaire avec une surexpression significative à H72. Des résultats similaires ont été reportés par Ozkok *et al.* (2016) dans une étude sur l'insuffisance rénale aiguë induite par injection intrapéritonéale de cisplatine (25 mg/kg de poids corporel) chez des souris C57BL/6 mâles. Cependant, malgré le fait que l'expression d'*IL1β* et *IL6* soit en partie dépendante de l'augmentation de l'expression de *TNFα* et *MCPI*, aucune surexpression de l'ARNm d'*IL1β* et *IL6* n'a été observée. Il est possible que cette sous-expression observée à J10 puisse résulter de la dégradation de l'ARNm d'*IL1β* et *IL6*. En conclusion, dans notre modèle de NAA induite chez des souris, une augmentation de l'inflammation est observable aux timings H72 et J10. Cette augmentation de l'inflammation pourrait être corroborée par une caractérisation de l'infiltration des cellules immunitaire dans le tissu rénal, ainsi que par le dosage des diverses cytokines étudiées.

Pour conclure cette caractérisation du modèle *in vivo*, une évaluation de la réponse anti-oxydante a été réalisée. Ainsi, l'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* est significativement augmentée à H72, comme l'avaient également montré par Liu *et al.* (2009) dans une étude sur la néphropathie aiguë induite avec du cisplatine (30 mg/kg de poids corporel) chez des souris C57BL/6 pendant 72 heures. Ensuite, une surexpression significative de l'ARNm de l'*HO-1* est observée aux timings H12, H24 et H72 alors qu'une sous-expression est observée au timing H96. Une surexpression est également observée chez des souris C57BL/6, 24 heures après l'induction d'une ischémie-reperfusion (Liu *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la SOD1 et la SOD2 présentent un schéma d'expression similaire avec une diminution de leur expression relative dès H12. À H24, la sous-expression observée pour l'ARNm des *SOD* est atténuée par comparaison avec la sous-expression observée au timing H12. Des résultats similaires ont été observés au niveau de l'abondance protéique de la SOD2 par Xu *et al.* (2016) au cours d'une étude menée sur les rats Sprague-Dawley dont l'insuffisance rénale était induite par choc septique pendant 24 heures. De plus, dans ce modèle, une stimulation de l'expression de *SIRT1* par le resvératrol permet de récupérer partiellement l'abondance protéique de SOD2 pour le groupe contrôle. En conclusion, une augmentation de la réponse anti-oxydante est observable durant la NAA induite chez des souris.

La dernière partie de l'expérimentation *in vivo* a consisté à évaluer l'évolution des SIRT1/3 tant au niveau de l'expression relative de l'ARNm qu'au niveau protéique, ainsi qu'à évaluer l'activité relative de SIRT3. Tout d'abord, l'expression relative des *SIRT1/3* a été évaluée au cours du protocole. Pour SIRT1, une oscillation de l'expression relative de son ARNm est observable depuis le premier temps d'intoxication avec une sous-expression aux timings H12, H48, H96 et J10. Des résultats similaires ont été précédemment reportés par Xu *et al.* (2016) lors d'une étude sur l'insuffisance rénale induite par choc septique chez des rats Sprague-Dawley. Cependant, dans cette étude, l'oscillation de SIRT1 n'a été observée qu'au niveau protéique et à des timings plus courts que ceux étudiés dans ce mémoire. En effet, Xu *et al.* (2016) ont mesuré une diminution progressive de l'abondance de la SIRT1 jusqu'à 8 heures après induction de l'insuffisance rénale aiguë par septicémie. Après ce timing, ils ont observé une augmentation de l'abondance protéique de SIRT1 jusqu'à 24 heures après chirurgie. En ce qui concerne SIRT3, une diminution significative de son expression est observée dès les premiers temps d'intoxication et présente un profil progressif. Les résultats obtenus pour le timing H72 ont été reportés par Morigi *et al.* (2015) dans une étude sur des souris C57BL/6J

intoxiquées par injection sous-cutanée de cisplatine (17,4 mg/kg de poids corporel) et sacrifiées après 3 jours. Pour ce qui est de l'expression protéique, une diminution significative est observée aux timings H96 et J10. Cette diminution de l'abondance protéique est déjà observée après 24 heures dans l'étude de Xu *et al.* (2016).

Pour conclure, suite à une NAA induite chez des souris mâles C57BL/6 par injection intrapéritonéale d'AA-I (3,5 mg/kg de poids corporel), une modulation de la réponse anti-oxydante, ainsi qu'une augmentation de l'inflammation et des dommages rénaux sont observables à partir de H72. Tous les résultats obtenus dans notre modèle semblent indiquer ce timing comme étant crucial dans le mécanisme de la NAA. Ces résultats pourraient toutefois être corroborés par des observations protéiques des divers acteurs. De plus, il semblerait qu'une tentative de récupération rénale soit observée au timing H96 avant de basculer dans une néphropathie de type chronique au timing J10. Finalement, l'abondance des SIRT1/3 est réduite au niveau de l'expression relative de l'ARNm et de l'expression protéique. Cette sous-expression des SIRT1/3 pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression relative de l'ARNm des *SOD1/2* et être en lien avec l'augmentation de l'expression relative de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires. Afin de vérifier cette hypothèse, une expérimentation de même type que celle réalisée lors de ce mémoire pourrait être réalisée sur des souris traitées au resvératrol afin d'augmenter l'abondance des SIRT1/3, ou encore avec des souris transgéniques surexprimant les gènes *SIRT1* ou *SIRT3* ou déficientes pour ces mêmes gènes. En effet, les souris *SIRT1*^{+/+}, *SIRT3*^{+/+}, *SIRT1*^{-/-} et *SIRT3*^{-/-} permettraient de faire un lien direct entre la sur- ou sous-expression de ces sirtuines et les acteurs pro-inflammatoires et/ou anti-oxydants modifiés lors de la NAA.

II. Expérimentation in vitro

Avant toute chose, la viabilité cellulaire a été évaluée en fonction de la concentration en AA utilisée et ce, pendant divers temps d'incubation. Pour ce faire, un test MTT et un test LDH ont été réalisés. Le premier permet d'évaluer la prolifération ou la mortalité cellulaire. Ce test repose sur l'activité de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale capable de réduire le MTT en son dérivé formazan. Le second permet d'évaluer le pourcentage de cytotoxicité des AA par le dosage de l'activité de LDH présente au niveau cellulaire, et libéré en cas de mortalité cellulaire dans les corps apoptotiques et le milieu de culture (en cas d'altérations de la membrane plasmique). Comme précédemment reporté par Zhang *et al.* (2011) lors de l'intoxication de cellules HK-2 par des AA-I (40 µM) durant 12, 24 et 48 heures, les résultats du test MTT obtenus dans ce mémoire indiquent une diminution temps-dépendante de la viabilité cellulaire. De plus, après 24 et 48 heures d'incubation des cellules en présence d'AA, une diminution de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en AA appliquée a également été observée. Cette diminution concentration-dépendante a été observée par Chen *et al.* (2010) lors d'une intoxication de cellules HK-2 à des concentrations de 10, 30 et 90 µM d'un mix AA-I/AA-II (40/60).

De plus, le test LDH permet de mieux visualiser l'effet concentration-dépendant. En effet, les résultats de ce test montrent, aux timings H3 et H12, une augmentation de la cytotoxicité en corrélation avec l'augmentation de la concentration testée. En ce qui concerne le timing H6, celui-ci a probablement dû être perturbé par une cause externe au vu de la mortalité importante présente dans le groupe contrôle, ne permettant donc pas de prendre en compte ce point expérimental. Finalement, pour une incubation des cellules de 24 heures, les concentrations de 50, 75 et 100 µM induisent une cytotoxicité plus faible que les concentrations de 10 et 25 µM. Cette diminution pourrait s'expliquer par la cytotoxicité plus élevée des concentrations de 50,

75 et 100 μM durant les timings plus précoces, induisant donc une mortalité cellulaire plus élevée en début d'intoxication. De ce fait, cela induit peut-être un biais cellulaire avec la sélection des cellules résistantes aux AA pour le timing H24, induisant de ce fait une mortalité cellulaire atténuée.

En conclusion, les timings H3, H6, H12 et H24 ont été conservés pour la suite des expérimentations, ainsi que la concentration de 50 μM en AA. Le timing H48 a été abandonné car la mortalité cellulaire y était trop élevée, avec seulement 25 à 30% de cellules vivantes à la fin de l'incubation. De plus, la concentration de 50 μM a été choisie sur base des résultats obtenus pour le test LDH. En effet, à cette concentration, une intoxication progressive des cellules est observable, permettant donc l'étude de l'évolution de l'intoxication depuis son stade le plus précoce. Cette concentration avait par ailleurs déjà décrite dans la littérature par Antoine *et al.* (2015) dans une étude sur des cellules HK-2 exposées à une concentration de 50 μM d'AA-I pendant 24 et 72 heures.

II.1. Protocole 1

Les altérations des cellules HK-2 induites par une concentration en AA de 50 μM ont été mises en évidence par le suivi de l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1*. La surexpression de la protéine KIM-1 lors de l'insuffisance rénale est utilisée depuis de nombreuses années comme biomarqueur chez les patients atteints de néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) (Han *et al.*, 2002). Depuis peu, la surexpression du gène codant pour cette protéine a également été mise en évidence *in vitro*, dans des cellules HK-2 exposées à des concentrations de 10 et 25 μM de cisplatine pendant 24 heures (Sohn *et al.*, 2013). Les résultats obtenus dans ce mémoire indiquent une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1* après 3 heures d'intoxication à une concentration de 50 μM , suggérant des altérations cellulaires précoces. Une diminution significative de l'expression de ce biomarqueur est ensuite observée après 12 et 24 heures d'intoxication.

Chez l'être humain, ce biomarqueur est détectable dans les urines à partir de 3 heures après le début des dommages rénaux aigus. De plus, 24 heures après le début du stress aigu, le niveau de protéine KIM-1 dans les urines retombe à son niveau basal (McIlory *et al.*, 2010). La diminution de l'expression de l'ARNm de *KIM-1* qui est observée dans ce mémoire pourrait donc être expliquée par un effet temps-dépendant de l'expression de cette protéine. Cette hypothèse est soutenue par la détection de la protéine dans les urines des patients seulement entre 3 et 24 heures après l'intoxication aux AA. Afin de corroborer cette hypothèse, une analyse cinétique de l'expression de KIM-1 au niveau protéique au cours des temps d'intoxication pourrait être réalisée. En conclusion, l'étude de l'abondance relative de l'ARNm de *KIM-1* nous indique une altération précoce des cellules HK-2 avec une augmentation significative après seulement 3 heures d'intoxication.

Ensuite, l'effet des AA sur la morphologie mitochondriale a été évalué. En effet, dans de nombreuses études réalisées sur les AA, la mitochondrie est décrite comme ayant un rôle clé dans l'intoxication des tubules proximaux, principalement par sa capacité à intégrer les signaux de mort cellulaire et à induire l'apoptose. Ces résultats ont notamment été observés dans une étude sur des rats Wistar mâles intoxiqués durant 1 à 5 jours par des AA (injection sous-cutanée, 10 mg/kg de poids corporel) (Pozdzik *et al.*, 2008). De plus, la fragmentation du réseau mitochondrial a été associée à plusieurs types d'apoptose (Karbowski & Youle, 2003). Or, il est connu que l'apoptose est un type de mort cellulaire couramment observé dans la NAA (Jadot *et al.*, 2017).

Dans le cadre de ce mémoire, une augmentation significative de la fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules HK-2 est observable à H24. Cette fragmentation pourrait être en lien avec une augmentation de l'apoptose dans les cellules intoxiquées aux AA, laquelle a été mise en évidence par Qi *et al.* (2007) sur ce même type cellulaire. Durant cette étude, Qi *et al.* (2007) ont intoxiqué les cellules avec des concentrations de 5, 10 et 25 μM d'AA-I durant 24 heures et ont observé une augmentation de l'abondance de la caspase 3 active. Dans cette même étude, des mitochondries isolées à partir de reins de rats mâles Sprague–Dawley ont été exposées à une concentration de 50 μM d'AA-I durant 20 minutes, permettant de mettre en évidence le gonflement des mitochondries (Qi *et al.*, 2007). En conclusion, une altération du réseau mitochondrial est observable dans les cellules exposées aux AA, laquelle pourrait être le signe d'un début d'apoptose. La caractérisation des mécanismes de mort cellulaire pourrait être réalisée au cours des différents temps d'intoxication des cellules afin de mieux comprendre les mécanismes de la NAA et le rôle du métabolisme énergétique dans ce type de mort cellulaire. De plus, d'autres paramètres pourraient également être investigués tels que l'activité respiratoire des mitochondries, ainsi que leur production d'ATP ou leur potentiel de membrane, afin d'évaluer plus en profondeur les altérations mitochondriales.

Ensuite, la réplication de l'ADN a été évaluée par l'analyse de l'abondance du marqueur PCNA au niveau de son expression relative en ARNm ainsi que par immunofluorescence. Aux timings H3 et H6, l'expression relative de l'ARNm de *PCNA* diminue significativement en comparaison avec les cellules contrôles. Une expression relative similaire au groupe contrôle est observable à H12 avant d'observer une différence d'expression après 24 heures d'intoxication. Mais ce résultat est à prendre avec précaution car c'est essentiellement l'abondance du transcrit de *PCNA* qui diminue dans les cellules contrôles. Des résultats comparables ont été observés pour le marquage en immunofluorescence de PCNA avec une première diminution significative de la proportion de noyaux positifs pour le marquage à H6 et H12, suivie d'une augmentation significative à H24. Le décalage observé à H3 et H12 entre l'expression relative de l'ARNm de *PCNA* et le marquage de la protéine en immunofluorescence est probablement dû au temps nécessaire à la cellule pour réaliser la traduction de l'ARNm. Bien que ces résultats n'aient encore jamais été reportés dans la littérature, Wang & Zhang (2008) ont également décrit une augmentation de la protéine PCNA en immunohistochimie dans des cellules LLC-PK1 (cellules de rein porcin) incubées pendant 24 heures dans du milieu contenant une concentration de 20 μM d'AA-I.

L'hypothèse qui pourrait être émise quant à la diminution de l'expression de PCNA observée dans notre modèle durant les premiers timings serait que, dans un premier temps, les cellules entrent en apoptose, induisant de ce fait un arrêt de la réplication de l'ADN. De plus, l'analyse de la biomasse des cellules mesurée par un dosage de protéines montre que la quantité de cellules récupérée après une incubation en présence d'AA présente une diminution significative dès 3 heures d'incubation. Cette diminution est comparable, quel que soit le temps d'incubation. Ces résultats, ajoutés à ceux obtenus pour PCNA, permettent d'émettre l'hypothèse d'une possible inhibition de la prolifération cellulaire. Cependant, afin d'appuyer cette hypothèse, un test plus approprié pour visualiser la prolifération cellulaire pourrait être réalisé, tel qu'un test d'incorporation de nucléotides marqués par les cellules.

La réponse anti-oxydante des cellules a ensuite été évaluée. L'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* est significativement augmentée à H6 et H12, suggérant une augmentation du stress oxydatif pour des temps relativement courts d'incubation des cellules en présence d'AA. Un accroissement de l'expression protéique de *NRF-2* a également été observée dans une étude sur des cellules HK-2 stressées avec de l' H_2O_2 pendant 4 heures (Lin *et al.* 2014). Ensuite, une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *HO-1* est observée depuis le timing H6. Des résultats comparables concernant l'expression relative de

l'ARNm de *HO-1* ont déjà été reportés par Johnson *et al.* (2010) chez des cellules HK-2 intoxiquées au sucrose de fer durant 18 heures. De plus, ces résultats pourraient être corroborés par une évaluation de l'expression protéique de NRF-2 et HO-1. Une diminution significative de l'expression relative de l'ARNm de *SOD1* est observée depuis H3 et ce jusqu'à la fin du protocole. Ces résultats n'ont jamais été reportés dans la littérature. Une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm de *SOD2* est observée au timing H3. À H6, cette expression redevient similaire à celle observée pour le groupe contrôle avant d'être diminuée pour des incubations plus longues (12 et 24 h). Cette sous-expression de l'ARNm de *SOD2* a notamment été reportée par Brennan *et al.* (2012) dans une étude sur des cellules HK-2 intoxiquées durant 48 heures avec du TGF- β 1.

En conclusion, une légère augmentation de la réponse anti-oxydante est observée dans les cellules exposées aux AA à partir du timing H6, avec une élévation de l'expression relative des gènes *NRF-2* et *HO-1*. Cette observation pourrait notamment être confirmée par un marquage en immunofluorescence des ROS, ou par une évaluation de l'activité des SOD. En effet, bien que leur expression soit significativement diminuée, l'activité des SOD pourrait être augmentée afin de pallier à cette diminution d'expression. De plus, la réduction de l'expression des *SOD* pourrait être due à une augmentation des acteurs pro-inflammatoires ou encore pro-fibrotiques, tels que le TGF- β 1 (Brennan *et al.* 2012). Une étude des mécanismes inflammatoires mis en place par les cellules permettrait de tester cette hypothèse.

Finalement, pour la première fois, l'expression des sirtuines 1 et 3 (*SIRT1/3*) a été évaluée au niveau de l'expression relative de l'ARNm et de l'expression protéique. En ce qui concerne l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1*, celle-ci reste constante dans les cellules exposées aux AA durant les premiers temps d'intoxication avant d'augmenter significativement à partir de H12. Cette surexpression de *SIRT1* pourrait être expliquée par une l'augmentation du stress oxydatif. En effet, l'expression de *SIRT1* est médiée par FOXO1, PPAR α/β et CREB, trois acteurs connus pour faire face au stress oxydatif et/ou à l'inflammation (Houtkooper *et al.* 2012 ; Xiong *et al.* 2011). Cette hypothèse de la participation de *SIRT1* dans la sensibilité ou la résistance des cellules aux AA pourrait être testée dans des cellules qui surexpriment ou n'expriment plus (invalidation du gène par une approche CRISP/Cas9) *SIRT1* et en recherchant les effets sur la mortalité cellulaire, les mécanismes impliqués et le stress oxydatif.

Pour ce qui est de l'abondance relative de l'ARNm de *SIRT3*, sa diminution observée après 6 heures de traitement des cellules aux AA pourrait être due à une augmentation de la mort cellulaire. L'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* est ensuite augmentée après H24 et pourrait être la conséquence de l'augmentation de l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1*. En effet, dans une étude sur des cellules THP-1 dans lesquels le gène *SIRT1* est silencé (« knock down » par des siRNA) et stimulées au LPS, l'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* n'est pas modifiée par rapport au contrôle. *A contrario*, ce même stress au LPS chez des cellules THP-1 exprimant la *SIRT1* induit une surexpression des *SIRT1/3*, permettant d'émettre l'hypothèse que l'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* est, en partie, dépendante de l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1* (Liu *et al.* 2015). Aucune différence significative n'est cependant observée au niveau protéique. Une hypothèse serait que la surexpression observée pour l'ARNm de *SIRT3* n'est pas suffisante que pour observer une différence au niveau protéique. En effet, bien qu'une différence significative soit observée, l'expression relative de l'ARNm de *SIRT3* ne présente un *fold increase* que de 1,3.

Finalement, après l'obtention des résultats concernant l'expression de *SIRT1*, il a également semblé intéressant d'étudier des temps d'incubation prolongés en présence de AA ; des temps de 24, 48, 72 et 96 heures ont dès lors été choisis afin de pouvoir établir un parallèle avec l'étude *in vivo*. Pour ces incubations plus longues, une concentration de 10 μ M d'AA-I a

été choisie, sur base des résultats obtenus pour le test LDH. En effet, à cette concentration la cytotoxicité est moindre, permettant donc la conservation d'assez de matériel biologique pour les analyses ultérieures.

II.2. Protocole 2

Les changements induits par une concentration de 10 μ M ont été évalués en étudiant l'expression relative de l'ARNm de *KIM-1*, tout comme pour le premier protocole. Une diminution significative de cette expression est observée dès le timing H24, jusqu'à la fin du protocole. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour une intoxication de 50 μ M, corroborant l'hypothèse selon laquelle l'expression de l'ARNm de *KIM-1* serait temps-dépendante (McIlory *et al.* 2010). De plus, une évaluation de l'expression protéique de cette protéine pourrait être réalisée dans le but d'évaluer ses changements d'abondance au cours du temps.

Le but de cette deuxième expérience étant d'évaluer l'expression de SIRT1 pendant des incubations plus longues des cellules en présence d'AA, l'expression de son ARNm, et de la protéine a donc été évaluée. Au niveau de l'expression relative de l'ARNm, une augmentation de *SIRT1* est observée à partir du timing H24. Une augmentation de l'expression protéique de SIRT1 est également observée à H72 et H96. Bien que ces résultats divergent de l'observation réalisée *in vivo*, ils permettent cependant d'émettre l'hypothèse que la SIRT1 pourrait être un acteur moléculaire important dans le cadre de l'intoxication aux AA. Son rôle devra passer par des expériences interférentielles visant à voir si ces changements d'expression sont à mettre en relation avec la sensibilité des cellules HK-2 aux AA.

II.3. Conclusion de l'expérimentation *in vitro*

Pour conclure, le traitement aux AA induit une réponse anti-oxydante directement au niveau cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'expression relative de *SIRT1*, probablement afin de faire face à ce stress. Une augmentation de l'activité des SIRT1 serait également à mettre en évidence afin de vérifier leur implication directe dans la lutte contre le stress oxydatif. Finalement, bien que *SIRT1* soit surexprimée dans les cellules HK-2, l'expression relative de son ARNm oscille au cours du protocole chez les souris intoxiquées aux AA. Cette différence d'expression pourrait être notamment due au fait que, pour le protocole *in vivo*, ce n'est pas uniquement l'impact au niveau des cellules des tubules proximaux qui est observé mais l'impact de la NAA dans tout le rein. Finalement, il se pourrait également que le modèle cellulaire lui-même induise un biais dans les résultats. En effet, ce sont des cellules seules qui sont étudiées ici et non la reconstitution d'un épithélium à partir de cellules HK-2. De plus, ces cellules sont non différenciées et ont toujours la capacité de proliférer, ce qui n'est plus le cas des cellules épithéliales dans un tubule proximal.

III. Conclusion et perspectives

En conclusion, le modèle *in vivo* utilisé dans ce mémoire reproduit, de manière fidèle, la physiopathologie observée chez les patients atteints de NAA. En effet, la caractérisation du modèle a permis de mettre en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques en urée et en créatinine à partir du timing H72. À ce même timing, une diminution du débit de filtration glomérulaire et une augmentation de la diurèse ont été observées. D'un point de vue histologique, une nécrose et une atrophie des tubules proximaux ont également été identifiées.

Tous ces paramètres avaient été reportés précédemment chez des patients souffrant de NAA, ainsi que dans de nombreux modèles *in vivo*.

Comme expliqué ci-avant, le caractère protecteur des sirtuines a été reporté à plusieurs reprises dans des modèles de néphropathies induites par le cisplatine, l'ischémie-reperfusion ou encore le choc septique (Hasegawa *et al.* 2010 ; Morigi *et al.* 2015). De plus, les SIRT1/3 permettent de lutter contre l'inflammation et le stress oxydatif, lesquels sont des caractéristiques de la NAA (Pozdzik *et al.* 2010 ; Wakino *et al.* 2015). L'étude de l'évolution des SIRT1/3 a donc semblé avoir un intérêt particulier dans un modèle d'insuffisance rénale induite par les AA, ainsi que dans un modèle d'intoxication de cellules épithéliales de tubules proximaux. Dans notre modèle *in vivo*, les SIRT1/3 apparaissent sous-exprimées durant le stress rénal aigu alors que dans le modèle *in vitro* elles apparaissent surexprimées. Etant donné leur fonctionnement intrinsèque, les SIRT1/3 jouent également un rôle dans la réponse anti-inflammatoire et anti-oxydante (Nogueiras *et al.* 2012). En effet, la sous-expression de SIRT1 pourrait être en lien avec l'augmentation de l'inflammation au timing H72. De même, l'oscillation observable pour l'expression relative de l'ARNm de *SIRT1* pourrait également être liée à l'oscillation de l'expression de *NRF-2* et *HO-1*.

Quant à la SIRT3, elle ne permet pas d'induire la transcription de gènes mais plutôt l'activation de plusieurs acteurs moléculaires (Nogueiras *et al.* 2012). De ce fait, une étude sur l'acétylation des protéines cibles de SIRT3, ou sur l'activité de ces acteurs, pourrait être réalisée afin de confirmer l'implication de cette sirtuine d'un point de vue cellulaire. De plus, une surexpression des SIRT1/3 pourrait permettre de lutter contre la NAA induite *in vivo*, comme reporté dans d'autres modèles de néphropathies (Hasegawa *et al.* 2010 ; Morigi *et al.* 2015). Afin de valider cette hypothèse, la réponse de souris surexprimant *SIRT1* ou *SIRT3* pourrait être étudiée dans le cadre de l'induction d'une NAA. Des souris KO pour le gène *SIRT3* pourraient également être utilisées, permettant ainsi de vérifier une augmentation de l'inflammation et/ou du stress oxydatif dans les mêmes conditions. De plus, ces mêmes souris pourraient être utilisées dans un protocole plus long afin d'évaluer dans quelle mesure les SIRT1/3 permettent également de protéger les souris du stress rénal chronique. Dans notre modèle cellulaire, les SIRT1/3 sont surexprimées durant l'intoxication aux AA, suggérant une réponse cellulaire précoce. Cette surexpression est reliée à une augmentation de la réponse anti-oxydante avec l'augmentation de l'expression relative de l'ARNm de *NRF-2* et *HO-1*. Afin de vérifier cette relation, le stress induit par les AA pourrait être étudié dans des cellules HK-2 surexprimant ou n'exprimant pas la SIRT1 ou la SIRT3.

De plus, afin d'étudier plus en détails les mécanismes de la NAA, l'apoptose pourrait être étudiée au cours des divers temps d'intoxication, notamment en triant les cellules en fonction de leur stade d'apoptose. De plus, la nécrose induite par les AA chez des cellules HK-2 pourrait également être mesurée. En effet, dans de nombreuses études *in vivo* (Lebeau *et al.* 2005 ; Pozdzik *et al.* 2008), la nécrose a été mise en évidence comme apparaissant plus tardivement que l'apoptose. Une étude cellulaire de ce phénomène pourrait donc permettre une meilleure compréhension de la dynamique caractérisant la NAA. Ensuite, le dysfonctionnement mitochondrial pourrait être caractérisé plus en profondeur en mesurant le potentiel mitochondrial ainsi qu'en évaluant le stress oxydatif avec un dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes. Une concentration plus élevée d'AA pourrait également être appliquée aux cellules afin de vérifier l'hypothèse qu'une concentration plus importante induirait une nécrose directe des cellules, ne leur permettant donc pas de s'adapter et d'augmenter l'expression des *SIRT1/3*. Une concentration plus faible d'AA pourrait également être investiguée, dans le but d'évaluer les modifications cellulaires qui se produiraient à une concentration subtoxique.

Bibliographie

- Abadie, J. (2003) 'PCNA-Abadie 2003.pdf', *Revue Française d'Histotechnologies*, 16(1), pp. 45–60.
- Akcay, A., Nguyen, Q. and Edelstein, C. (2009) 'Mediators of inflammation in acute kidney injury', *Mediators of Inflammation*, 2009.
- Antoine, M., Debelle, F., Piccirilli, J., El, F., Declèves, A.-E. and De Prez, E. (2015) 'Human bone morphogenetic protein-7 does not counteract aristolochic acid-induced renal toxicity', *Journal of Applied Toxicology*.
- Arlt, V. M., Stiborová, M. and Schmeiser, H. H. (2002) 'Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review', *Mutagenesis*, 17(4), pp. 265–277. Available at: <http://mutage.oxfordjournals.org/content/17/4/265.abstract>.
- Avalos, J., Bever, K. and Wolberger, C. (2005) 'Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: Altering the NAD⁺ cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme', *Molecular Cell*, 17(6), pp. 855–868.
- Bao, J., Lu, Z., Joseph, J., Carabenciov, D., Dimond, C., Pang, L., Samsel, L., McCoy, J.-P., Leclerc, J., Nguyen, P., Gius, D. and Sack, M. (2010) 'Characterization of the murine SIRT3 mitochondrial localization sequence and comparison of mitochondrial enrichment and deacetylase activity of long and short SIRT3 isoforms', *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(1), pp. 238–247.
- Bause, A. and Haigis, M. (2013) 'SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress', *Experimental Gerontology*, 48(7), pp. 634–639.
- Bonventre, J. and Yang, L. (2011) 'Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), pp. 4210–4221.
- Brennan, E., Morine, M., Walsh, D., Roxburgh, S., Lindenmeyer, M., Brazil, D., Gaora, P., Roche, H., Sadlier, D., Cohen, C., The Genie Consortium, Godson, C. and Martin, F. (2012) 'Next-generation sequencing identifies TGF- β 1-associated gene expression profiles in renal epithelial cells reiterated in human diabetic nephropathy', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(4), pp. 589–599.
- Camussi, G., Deregibus, M., Bruno, S., Cantaluppi, V. and Biancone, L. (2010) 'Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 78(9), pp. 838–848.
- Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S. and Batra, S. K. (2012) 'The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1826(1), pp. 129–169.
- Chang, W., Li, K., Guan, F., Yao, F., Yu, Y., Zhang, M., Hatch, G. M. and Chen, L. (2016) 'Berberine Pretreatment Confers Cardioprotection Against Ischemia – Reperfusion Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes', *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*.
- Chawla, L. and Kimmel, P. L. (2012) 'Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome', *Kidney International*, 82(5), pp. 516–524.

Chen, Y., Chiang, S., Wu, H., Kao, S., Hsiang, C., Ho, T. and Lin, J. (2010) 'Microarray analysis reveals the inhibition of nuclear factor-kappa B signaling by aristolochic acid in normal human kidney (HK-2) cells', *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 31, pp. 227–236.

Coca, S., Singanamala, S. and Parikh, C. (2012) 'Chronic kidney disease after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis', *Kidney International*, 81(5), pp. 442–448.

Cooper, H., Huang, J.-Y., Verdin, E. and Spelbrink, J. (2009) 'A New Splice Variant of the Mouse SIRT3 Gene Encodes the Mitochondrial Precursor Protein', *PLoS ONE*, 4(3), p. e4986.

Cosyns, J.-P., Dehoux, J.-P., Guiot, Y., Goebbels, R.-M., Robert, A., Bernard, A. and Van Ypersele De Strihou, C. (2001) 'Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: A model of Chinese herbs nephropathy?', *Kidney International*, 59(6), pp. 2164–2173.

Debelle, F., Nortier, J., De Prez, E., Garbar, C., Vienne, A., Salmon, I., Deschodt-lanckman, M. and Vanherweghem, J.-L. (2002) 'Aristolochic Acids Induce Chronic Renal Failure with Interstitial Fibrosis in Salt-Depleted Rats', *Journal of American Society of Nephrology*, 13, pp. 431–436.

Debelle, F., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2008) 'Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem', *Kidney International*, 74, pp. 158–169.

Debelle, F., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2009) 'Néphropathie aux acides aristolochiques : de l'observation clinique au modèle expérimental', *Flammarion Médecine-Sciences-Actualité Néphrologique*, pp. 188–200.

Declèves, A.-E., Jadot, I., Colombaro, V., Martin, B., Voisin, V., Nortier, J. and Caron, N. (2016) 'Protective effect of nitric oxide in aristolochic acid-induced toxic acute kidney injury: an old friend with new assets', *Experimental Physiology*, 101(1), pp. 193–206.

Dickman, K., Sweet, D., Bonala, R., Ray, T. and Wu, A. (2011) 'Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney', *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 338(2), pp. 588–597.

Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E. J., Booth, R., Gabay, O. and Hall, D. (2011) 'Tumor necrosis factor α -mediated cleavage and inactivation of sirT1 in human osteoarthritic chondrocytes', *Arthritis and Rheumatism*, 63(8), pp. 2363–2373.

Ferenbach, D. and Bonventre, J. (2016) 'Acute kidney injury and chronic kidney disease: From the laboratory to the clinic', *Nephrologie & Thérapeutique*, 12, pp. S41–S48.

Finkel, T., Deng, C.-X. and Mostoslavsky, R. (2009) 'Recent progress in the biology and physiology of sirtuins', *Nature*, 460(7255), pp. 587–591.

Flick, F. and Bernhard, L. (2012) 'Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications', *Frontiers in Pharmacology*, 3 FEB(February), pp. 1–13.

Fu, L. and Li, J. (2009) 'A Systematic Review of Single Chinese Herbs for Alzheimer's Disease Treatment', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Funk, J. and Schnellmann, R. (2013) 'Accelerated recovery of renal mitochondrial and tubule homeostasis with SIRT1/PGC-1 α activation following ischemia-reperfusion injury', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier B.V., 273(2), pp. 345–354.

Gallí, M., Van Gool, F. and Leo, O. (2011) 'Sirtuins and inflammation: Friends or foes?', *Biochemical Pharmacology*, 81(5), pp. 569–576.

Galvan, D., Green, N. and Danesh, F. (2017) 'The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease', *Kidney International*, 92(5), pp. 1051–1057.

Gao, R., Chen, J., Hu, Y., Li, Z., Wang, S., Shetty, S. and Fu, J. (2014) 'Sirt1 deletion leads to enhanced inflammation and aggravates endotoxin-induced acute kidney injury', *PLoS ONE*, 9(6), pp. 3–9.

Giralt, A. and Villarroya, F. (2012) 'SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging', *Biochemical Journal*, 444(1), pp. 1–10.

Gökmen, R., Cosyns, J.-P., Arlt, V., Stiborová, M., Phillips, D., Schmeiser, H., Simmonds, M., Cook, T., Vanherweghem, J.-L., Nortier, J. and Lord, G. (2013) 'The Epidemiology, Diagnosis, and Management of Aristolochic', *Annals of Internal Medicine*, 158, pp. 469–477.

Gregory, R., Chendrimada, T., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) 'Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing', *Cell*, 123(4), pp. 631–640.

Grollman, A., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu, L., Moll, U., Suzuki, N., Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N., Turesky, R., Goodenough, A., Rieger, R., Vukelić, M. and Jelaković, B. (2007) 'Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), pp. 12129–12134.

Gueutin, V., Deray, G., Isnard-bagnis, C. and Janus, N. (2011) 'La physiologie rénale', *Journal de Pharmacie Clinique*, 30(4), pp. 209–214.

Haigis, M. and Guarente, L. (2006) 'Mammalian sirtuins — emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction', *Genes & Development*, 20, pp. 2913–2921.

Han, W., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. and Bonventre, J. (2002) 'Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury', *Kidney International*, 62, pp. 237–244.

Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., Sueyasu, K., Washida, N., Tokuyama, H., Tzukerman, M., Skorecki, K., Hayashi, K. and Itoh, H. (2010) 'Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function', *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), pp. 13045–13056.

Houtkooper, R., Pirinen, E. and Auwerx, J. (2012) 'Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(4), pp. 225–238.

Huang, H.-C., Nguyen, T. and Pickett, C. (2002) 'Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp. 42769–42774.

Huang, L., Scarpellini, A., Funck, M., Verderio, E. and Johnson, T. (2013) 'Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology', *Nephron extra*, 3(1), pp. 12–29.

Hubbard, B., Riera, T., Lee, J., E, S. Y., Lamming, D. and Pentelute, B. (2013) 'Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators', *Science*, 339(339), pp. 1216–1219.

Isnard Bagnis, C., Deray, G., Baumelou, A., Le Quintrec, M. and Vanherweghem, J.-L. (2004) 'Herbs and the kidney', *American Journal of Kidney Diseases*. National Kidney Foundation, Inc., 44(1), pp. 1–11.

Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. and Reinberg, D. (2012) 'SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 32(24), pp. 5022–5034.

Jadot, I., Colombaro, V., Martin, B., Habsch, I., Botton, O., Nortier, J., Declèves, A.-E. and Caron, N. (2017) 'Restored nitric oxide bioavailability reduces the severity of acute-to-chronic transition in a mouse model of aristolochic acid nephropathy', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–19.

Jadot, I., Declèves, A.-E., Nortier, J. and Caron, N. (2017) 'An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy : Update of the Literature', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(297), pp. 1–24.

Johnson, A., Becker, K. and Zager, R. (2010) 'Parenteral iron formulations differentially affect MCP-1, HO-1, and NGAL gene expression and renal responses to injury.', *American journal of physiology. Renal physiology*, 299(2), pp. F426–F435.

Karbowski, M. and Youle, R. J. (2003) 'Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis', *Cell Death and Differentiation*, 10, pp. 870–880.

Kim, D. H., Jung, Y. J., Lee, J. E., Lee, A. S., Kang, K. P., Lee, S., Park, S. K., Han, M. K., Lee, S. Y., Ramkumar, K. M., Sung, M. J. and Kim, W. (2011) 'SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53.', *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(2), pp. F427–35. doi: 10.1152/ajprenal.00258.2010.

Kinsey, G., Li, L. and Okusa, M. (2008) 'Inflammation in acute kidney injury', *Nephron - Experimental Nephrology*, 109(4).

Koyama, T., Kume, S., Koya, D., Araki, S.-I., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sugimoto, T., Haneda, M., Sugaya, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H. and Uzu, T. (2011) 'SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells', *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), pp. 1258–1267.

Kriz, W. and Bankir, L. (1988) 'A standard nomenclature for structures of the kidney', *Kidney International*, 33, pp. 1–7.

Kume, S., Kitada, M. and Kanasaki, K. (2013) 'Anti-aging molecule, Sirt1: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy', *Archives of Pharmacal Research*, 36, pp. 230–236.

Kupchan, M. and Doskotch, R. (1962) 'Aristolochic Acid, the Active Principle of *Aristolochia indica*', *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 5(3), pp. 657–659.

Lacour, B. (2013) 'Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales', *Revue Francophone des Laboratoires*, 451, pp. 25–37.

Lebeau, C., Debelle, F., Arlt, V., Pozdzik, A., De Prez, E., Phillips, D., Deschodt-Lanckman, M., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2005) 'Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: Functional and histological studies', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(11), pp. 2321–2332.

Lin, M., Li, L., Zhang, Y., Zheng, L., Xu, M., Rong, R. and Zhu, T. (2014) 'Baicalin ameliorates H₂O₂ induced cytotoxicity in HK-2 cells through the inhibition of ER stress and the activation of Nrf2 signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), pp. 12507–12522.

Liu, M., Grigoryev, D., Crow, M., Haas, M., Yamamoto, M., Reddy, S. and Rabb, H. (2009) 'Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 76(3), pp. 277–285.

Liu, N. and Zhuang, S. (2015) 'Treatment of chronic kidney diseases with histone deacetylase inhibitors', *Frontiers in Physiology*, (April).

Liu, T. F., Vachharajani, V., Millet, P., Bharadwaj, M. S., Molina, A. J. and McCall, C. E. (2015) 'Sequential Actions of SIRT1-RELB-SIRT3 Coordinate Nuclear-Mitochondrial Communication during Immunometabolic Adaptation to Acute Inflammation and Sepsis', *The Journal of Biological Chemistry*, 290, pp. 396–408.

Liu, T., Liu, X. and Li, W. (2016) 'Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy', *Oncotarget*, 7(26), pp. 40800–40815.

Luo, Q. hui, Chen, M. lu, Sun, F. jiao, Chen, Z. li, Li, M. yang, Zeng, W., Gong, L., Cheng, A. chun, Peng, X., Fang, J., Tang, L. and Geng, Y. (2014) 'KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 397, pp. 53–60.

Mantle, P., Herman, D. and Tatu, C. (2016) 'Is Aristolochic Acid Really the Cause of the Balkan Endemic Nephropathy?', *Journal of Controversies in Biomedical Research*, 2(1), pp. 9–20.

McIlroy, D., Wagener, G. and Lee, T. (2010) 'Biomarkers of Acute Kidney Injury', *Anesthesiology*, 112, pp. 998–1004.

Mengs, U., Lang, W. and Poch, J. A. (1982) 'The carcinogenic action of aristolochic acid in rats', *Archives of Toxicology*, 51(2), pp. 107–119.

Michan, S. and Sinclair, D. (2007) 'Sirtuins in mammals: insights into their biological function', *The Biochemical journal*, 404, pp. 1–13.

Morigi, M., Perico, L., Rota, C., Longaretti, L., Conti, S., Rottoli, D., Novelli, R., Remuzzi, G. and Benigni, A. (2015) 'Sirtuin 3 – dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(2), pp. 715–726.

Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D. and Inagaki, N. (2008) 'Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: Shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1), pp. 174–179.

Navarro-Gonzalez, J. and Mora-Fernandez, C. (2008) 'The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(3), pp. 433–442.

Nigam, S., Bush, K., Martovetsky, G., Ahn, S.-Y., Liu, H., Richard, E., Bhatnagar, V. and Wu, W. (2015) 'The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective', *Physiological Reviews*, 95(1), pp. 83–123.

Nogueiras, R., Habegger, K., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A., Dietrich, M., Horvath, T., Sinclair, D., Pfluger, P. and Tschöp, M. (2012) 'Sirtuin 1 and Sirtuin 3: Physiological modulators of metabolism', *Physiological Reviews*, 92, pp. 1479–1514.

Nortier, J., Deschodt-lanckman, M., Simon, S., Thielemans, N., Prez, E., Depierreux, M., Tielemans, C., Richard, C., Lauwerys, R., Bernard, A. and Vanherweghem, J.-L. (1997) 'Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy : Monitoring by neutral endopeptidase enzymuria', *Kidney International*, 51, pp. 288–293.

Nortier, J. L., Muniz Martinez, M.-C., Schmeiser, H. H., Arlt, V. M., Bieler, C. A., Petein, M., Depierreux, M. F., De Pauw, L., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P. and Vanherweghem, J.-L. (2000) 'Urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herb (Aristolochia fangchi)', *The New England Journal of Medicine*, 342(23), pp. 1686–1692.

Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T. and Vanherweghem, J.-L. (2015) 'Néphropathie aux acides aristolochiques («néphropathie aux herbes chinoises»)', *Néphrologie & Thérapeutique*, 820, pp. 1–15.

Nortier, J., Pozdzik, A., Roumeguere, T. and Vanherweghem, J. L. (2015) 'Néphropathie aux acides aristolochiques ("néphropathie aux herbes chinoises")', *Néphrologie et Thérapeutique*, 11(7), pp. 574–588.

Perviz, S., Khan, H. and Pervaiz, A. (2016) 'Plant Alkaloids as an Emerging Therapeutic Alternative for the Treatment of Depression', *Frontiers in Pharmacology*, 7(28).

Pozdzik, A., Berton, A., Schmeiser, H., Missoum, W., Decaestecker, C., Salmon, I., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2010) 'Aristolochic acid nephropathy revisited : a place for innate and adaptive immunity ?', *Histopathology*, 56, pp. 449–463.

Pozdzik, A., Salmon, I., Debelle, F., Decaestecker, C., Brander, V. de, Verbeelen, Deschodt-Lanckman, M., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2008) 'Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 73(5), pp. 595–607.

Pozdzik, A., Salmon, I., Husson, C., Decaestecker, C., Rogier, E., Bourgeade, M. F., Deschodt-Lanckman, M., Vanherweghem, J.-L. and Nortier, J. (2008) 'Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(8), pp. 2480–2491.

Qi, X., Cai, Y., Gong, L., Liu, L., Chen, F., Xiao, Y., Wu, X., Li, Y., Xue, X. and Ren, J. (2007) 'Role of mitochondrial permeability transition in human renal tubular epithelial cell death induced by aristolochic acid', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, pp. 105–110.

Rasouri, S., Lagouge, M. and Auwerx, J. (2007) 'Sirt1/Pgc-1 Un axe neuroprotecteur ?', *Médecine/Sciences*, 23(10), pp. 840–844.

Schwer, B. and Verdin, E. (2008) 'Conserved Metabolic Regulatory Functions of Sirtuins', *Cell Metabolism*, 7.

Sebastián, C., Satterstrom, K., Haigis, M. and Mostoslavsky, R. (2012) 'From Sirtuin Biology to Human Diseases : An Update', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), pp. 42444–42452.

Sekine, T., Miyazaki, H. and Endou, H. (2006) 'Molecular physiology of renal organic anion transporters', *American journal of physiology. Renal physiology*, 290, pp. 251–261.

Shibutani, S., Dong, H., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F. and Grollman, A. (2007) 'Selective toxicity of aristolochic acids I and II', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(7), pp. 1217–1222.

Silverthorn, D. U. (2007) *Physiologie humaine - Une approche intégrée*. 4th edn. Edited by P. Education.

Singer, E., Markó, L., Paragas, N., Barasch, J., Dragun, D., Müller, D. N., Budde, K. and Schmidt-Ott, K. M. (2013) 'Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: Pathophysiology and clinical applications', *Acta Physiologica*, 207(4), pp. 663–672.

Singh, S., Schragenheim, J., Cao, J., Falck, J., Abraham, N. and Bellner, L. (2016) 'PGC-1 alpha regulates HO-1 expression, mitochondrial dynamics and biogenesis: Role of epoxyeicosatrienoic acid', *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. Elsevier Inc., 125, pp. 8–18.

Smith, B., Hallows, W. and Denu, J. (2008) 'Mechanisms and Molecular Probes of Sirtuins', *Chemistry and Biology*, 15(10), pp. 1002–1013.

Sohn, S., Young, S., Sik, H., Chun, Y., Young, S., Hee, S. and Moon, A. (2013) 'In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells', *Toxicology Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 217(3), pp. 235–242.

Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V. and Schmeiser, H. (2008) 'Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy', *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 658(1–2), pp. 55–67.

Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Laňková, M., Kumstýřová, T., Wiessler, M. and Schmeiser, H. (2003) 'Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: Evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase', *Carcinogenesis*, 24(10), pp. 1695–1703.

Tamaki, N., Orihuela-Campos, R. C., Inagaki, Y., Fukui, M., Nagata, T. and Ito, H.-O. (2014) 'Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 75, pp. 222–229.

Tögel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C. and Westenfelder, C. (2005) 'Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms', *American journal of physiology. Renal physiology*, 289, pp. 31–42.

Vaidya, V., Ferguson, M. and Bonventre, J. (2008) 'Biomarkers of Acute Kidney Injury', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), pp. 463–493.

Vanherweghem, J.-L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. and Vanhaelen, M. (1993) 'Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs', *The Lancet*, 341(8842), pp. 387–391.

Vanherweghem, J., Debelle, F., Muniz-Martinez, M.-C. and Nortier, J. (2003) 'Aristolochic acid nephropathy after Chinese herbal remedies', *Clinical Nephrotoxins*, 2, pp. 579–586.

Vassilopoulos, A., Fritz, K., Petersen, D. and Gius, D. (2011) 'The human sirtuin family : Evolutionary divergences and functions', *Genome update*, 5(5), pp. 485–496.

Venkatachalam, M., Weinberg, J., Kriz, W. and Bidani, A. (2015) 'Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression', *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(8), pp. 1765–1776.

Wakino, S., Hasegawa, K. and Itoh, H. (2015) 'Sirtuin and metabolic kidney disease', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 88(4), pp. 691–698.

Wang, W. and Zhang, J. (2008) 'Protective effect of erythropoietin against aristolochic acid-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells', *European Journal of Pharmacology*, 588, pp. 135–140.

Wheater, P. R., Young, B. and Heath, J. (2001) *Histologie fonctionnelle*. 4th edn. Edited by de Boeck.

Xiong, S., Salazar, G., Patrushev, N. and Wayne, A. (2011) 'FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression', *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), pp. 5289–5299.

Xu, S., Gao, Y., Zhang, Q., Wei, S., Chen, Z., Dai, X., Zeng, Z. and Zhao, K. (2016) 'SIRT1 / 3 Activation by Resveratrol Attenuates Acute Kidney Injury in a Septic Rat Model', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Yang, Y., Hubbard, B., Sinclair, D. and Tong, Q. (2010) 'Characterization of murine SIRT3 transcript variants and corresponding protein products', *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(4), pp. 1051–1058.

Zhang, L., Li, J., Jiang, Z., Sun, L., Mei, X., Yong, B. and Zhang, L. (2011) 'Inhibition of aquaporin-1 expression by RNAi protects against aristolochic acid I-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial (HK-2) cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(1), pp. 68–73.

Zhao, W.-Y., Zhang, L., Sui, M.-X., Zhu, Y.-H. and Zeng, L. (2016) 'Protective effects of sirtuin 3 in a murine model of sepsis-induced acute kidney injury', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 33201. doi: 10.1038/srep33201.

Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, X., Xu, X., Zou, H. and Qiu, J. (2011) 'Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in Fibroblasts', *PLoS ONE*, 6(11), p. e27081.

Zhuo, J. and Li, X. (2013) 'Proximal nephron', *Comprehensive physiology*, 3(3), pp. 1079–1123.

Zschoernig, B. and Mahlknecht, U. (2008) 'SIRTUIN 1: Regulating the regulator', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(2), pp. 251–255.

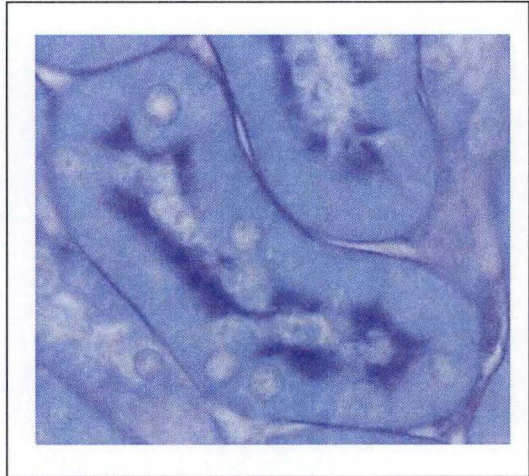
Annexes

Altérations décrites

Tubules proximaux contrôle



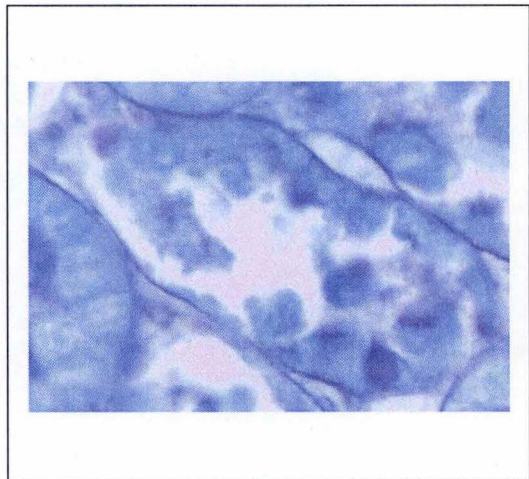
Noyaux décolorés



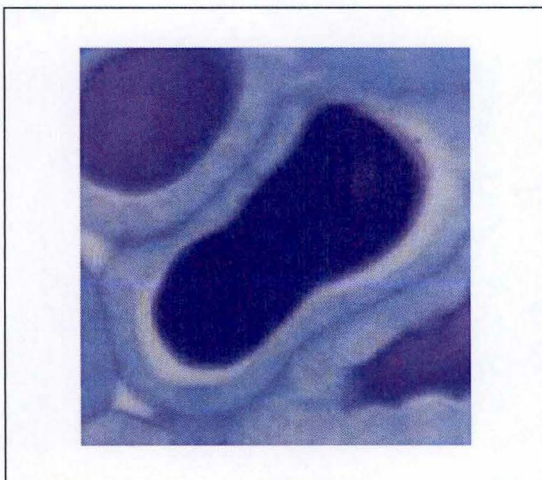
Altération de la bordure en brosse



Tubule proximal nécrotique



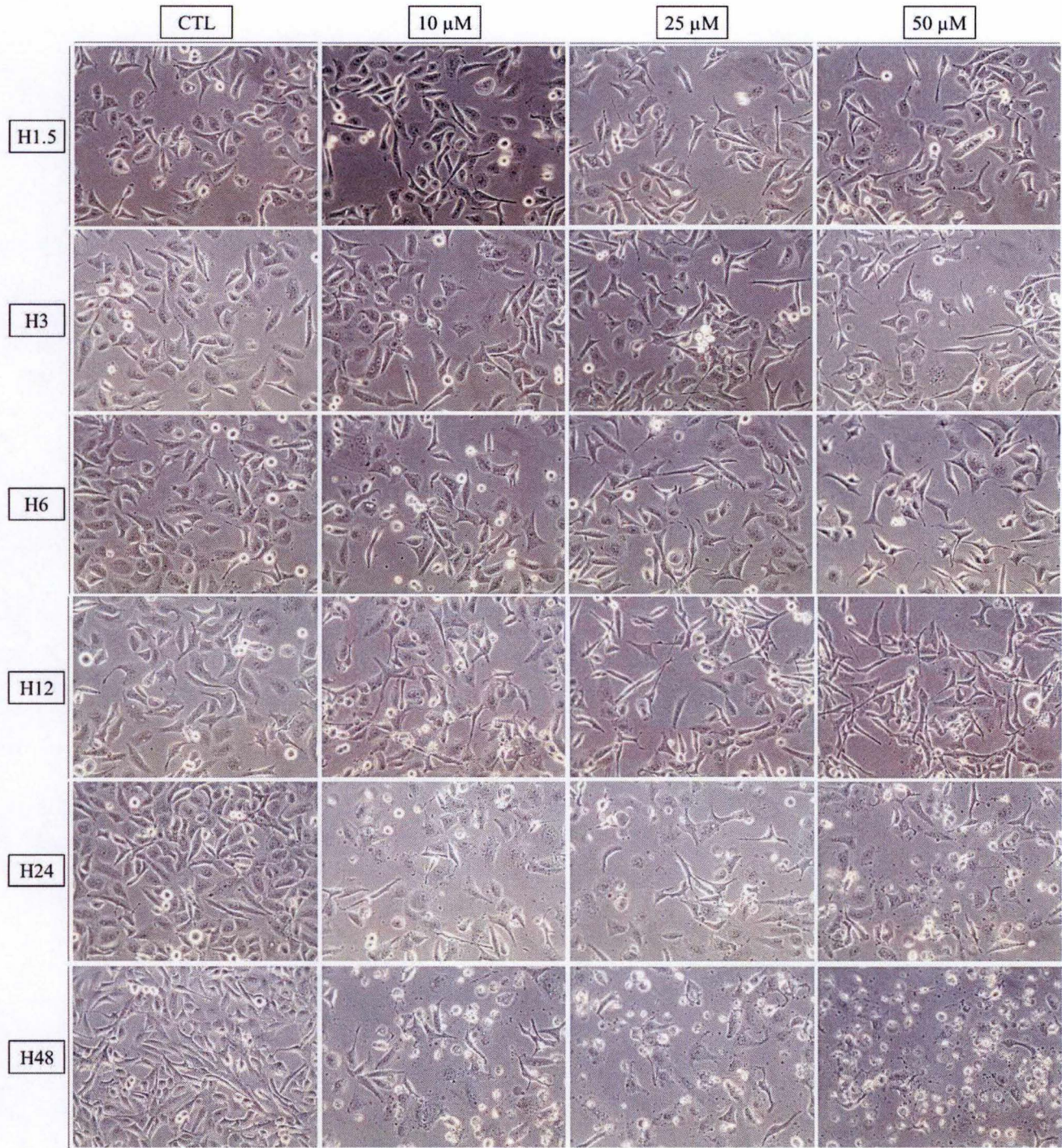
Protéinurie



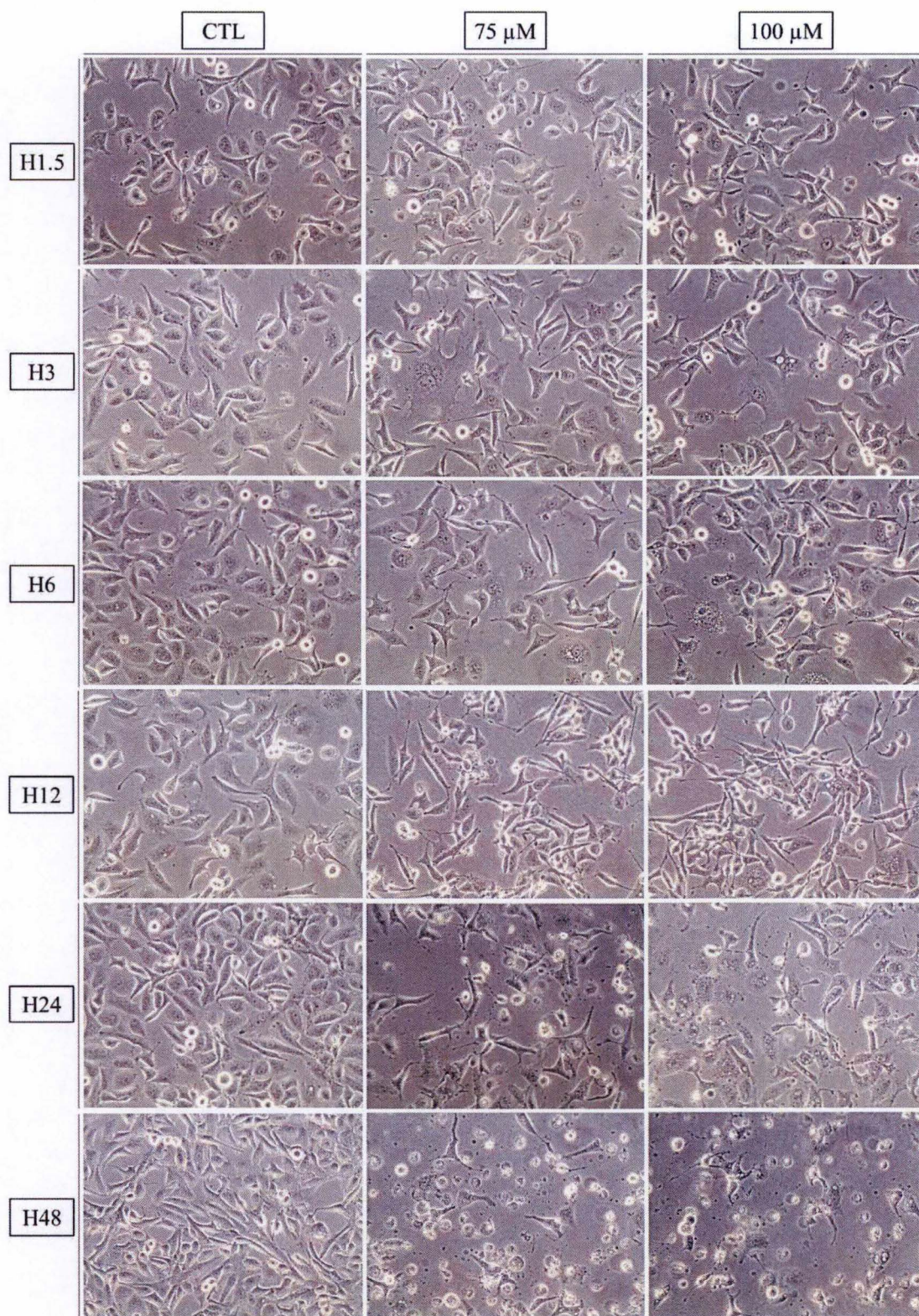
Tubule proximal atrophique



Micrographies



Micrographies des cellules intoxiquées pendant des temps croissants (1 heure 30, 3, 6, 12, 24 et 48 heures) avec des concentrations de 10, 25 et 50 μ M d'AA. Grossissement 200x.



Micrographies des cellules intoxiquées pendant des temps croissants (1 heure 30, 3, 6, 12, 24 et 48 heures) avec des concentrations de 175 et 100 μ M d'AA. Grossissement 200x.